

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



**APORTACIONES MICROBIOLÓGICAS A LA
VALORACIÓN DE ANTIMICROBIANOS E
INMUNIZACIÓN FRENTE A *NEISSERIA MENINGITIDIS***

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR Lourdes Anta Carabias**

Bajo la dirección de los Doctores:
José Prieto Prieto
M^a Luisa Gómez-Lus Centellés

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1858-2

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III

**APORTACIONES MICROBIOLÓGICAS A LA VALORACIÓN DE
ANTIMICROBIANOS E INMUNIZACIÓN FRENTE A
Neisseria meningitidis.**

TESIS DOCTORAL

Lourdes Anta Carabias

Madrid, Marzo 2001

D. JOSÉ PRIETO PRIETO, Catedrático del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y D^a MARÍA LUISA GÓMEZ-LUS CENTELLÉS, Profesora titular del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación, titulado: APORTACIONES MICROBIOLÓGICAS A LA VALORACIÓN DE ANTIMICROBIANOS E INMUNIZACIÓN FRENTE A *Neisseria meningitidis*, CONSTITUYE LA Memoria presentada por Lourdes Anta Carabias para aspirar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, y ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, Marzo de 2001.

Fdo. Profa. Dra. M^a Luisa Gómez-Lus Centelles

Fdo. Prof. Dr. José Prieto Prieto

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. José Prieto Prieto, por la confianza que depositó en mi brindándome la oportunidad de realizar este trabajo, así como por sus consejos y orientaciones.

A la Profa. Dra. M^a Luisa Gómez-Lus Centelles, por su continuo estímulo y ayuda, por su dedicación en la preparación y revisión de este trabajo, y por sus siempre optimistas consejos.

A la Dra. Carmen Ramos Tejera por su incansable presencia en las tesis doctorales que se han realizado en el Depto. de Microbiología I.

A todos mis compañeros del laboratorio, Luis, Lola, Manoli, Beatriz, Javi, David, Eva, Raquel, Almudena y Fernando, con los que he compartido tantas horas de trabajo y sobremesas, por su apoyo, comprensión y sobre todo su amistad.

A todos aquellos que, de algún modo, hayan contribuido a que este proyecto saliera adelante, y que sería muy largo de enumerar.

Por último y muy especialmente a mis padres, a los que dedico este trabajo, por su incondicional apoyo, dedicación y generosidad.

A todos muchas gracias.

A mis padres

**A mis hermanos:
Jose, Luismi y Fran**

ÍNDICE

INDICE

ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Neisseria meningitidis</i>	2
1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	2
1.2. CARÁCTERÍSTICAS.....	3
1.3. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA.....	4
1.3.1. Polisacárido capsular.....	5
1.3.2. Proteínas de membrana externa.....	6
1.3.3. Lipopolisacárido.....	6
1.3.4. Pili.....	7
1.3.5. Proteasa IgA ₁	7
1.4. FACTORES DE VIRULENCIA.....	8
1.5. PATOGENIA.....	9
2. ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA	11
2.1. DIAGNÓSTICO.....	12
2.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	14
2.3. TRATAMIENTO Y SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.....	16
2.4. INMUNIDAD.....	18
3. VACUNAS ANTIMENINGOCÓCICAS	20
3.1. TIPOS DE VACUNAS ANTIMENINGOCÓCICAS.....	22
3.1.1. Vacunas de polisacáridos capsulares.....	22
3.1.2. Vacunas conjugadas.....	23
3.1.3. Vacuna frente al serogupo B.....	24

4. ANTIMICROBIANOS	25
4.1. BETALACTÁMICOS	26
4.1.1. Penicilinas.....	26
4.1.1.1. Mecanismo de acción.....	26
4.1.1.2. Mecanismos de resistencia.....	27
4.1.1.3. Farmacocinética.....	28
4.1.1.4. Indicaciones.....	28
4.1.2. Clavamas.....	29
4.1.3. Amoxicilina / ácido clavulánico.....	29
4.1.3.1. Estructura química.....	30
4.1.3.2. Actividad antibacteriana.....	31
4.1.3.3. Indicaciones.....	31
4.1.3.4. Farmacocinética.....	31
4.2. QUINOLONAS	32
4.2.1. Mecanismo de acción.....	32
4.2.2. Mecanismos de resistencia.....	32
4.2.3. Indicaciones.....	33
4.2.4. Ciprofloxacino.....	33
4.2.4.1. Estructura química.....	33
4.2.4.2. Actividad antibacteriana.....	34
4.2.4.3. Farmacocinética.....	34
4.2.5. Trovafloxacino.....	35
4.2.5.1. Estructura química.....	35
4.2.5.2. Actividad antibacteriana.....	36
4.2.5.3. Farmacocinética.....	36

4.3. MACRÓLIDOS.....	36
4.3.1. Mecanismo de acción.....	37
4.3.2. Mecanismos de resistencia.....	37
4.3.3. Indicaciones.....	37
4.3.4. Claritromicina.....	38
4.3.4.1. Estructura química.....	38
4.3.4.2. Actividad antibacteriana.....	39
4.3.4.3. Farmacocinética.....	39
4.4. RIFAMICINAS.....	39
4.4.1. Mecanismo de acción.....	40
4.4.2. Actividad antibacteriana.....	40
4.4.3. Rifampicina.....	40
4.4.3.1. Estructura química.....	40
4.4.3.2. Mecanismos de resistencia.....	41
4.4.3.3. Farmacocinética.....	42
4.4.3.4. Indicaciones.....	42
II. OBJETIVOS.....	43
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
1. MATERIAL.....	46
1.1. MICROORGANISMO.....	46
1.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	46
1.3. SOLUCIONES TAMPON.....	46
1.4. REACTIVOS, COMPUESTOS QUIMICOS Y BIOLÓGICOS.....	46

1.5. ANTIMICROBIANOS.....	47
1.6. LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.....	47
1.7. VOLUNTARIOS.....	48
1.8. VACUNA.....	48
2. MÉTODO.....	49
2.1. VALORACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS.....	49
2.1.1. Curva de crecimiento de <i>N. meningitidis</i> C-11.....	49
2.1.2. Determinación de la Concentración mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB).....	50
2.1.3 Determinación de las Curvas de letalidad y sub-CMI.....	51
2.1.4 Determinación del Efecto postantibiótico (EPA).....	53
2.2. VALORACIÓN DE LA INMUNIZACIÓN.....	55
2.2.1. Selección de voluntarios.....	55
2.2.2. Reconstitución y administración de la vacuna.....	56
2.2.3. Tratamiento.....	56
2.2.3.1. Toma de muestra sanguínea.....	56
2.2.3.2. Obtención y tratamiento de suero humano.....	56
2.2.3.3. Aislamiento de PMNs.....	57
2.2.3.4. Cómputo y ajuste de PMNs.....	58
2.2.3.5. Estudio de la viabilidad celular.....	59
2.2.3.6. Determinación de las curvas de muerte.....	59
2.2.3.7. Determinación de los anticuerpos bactericidas.....	61
2.2.3.8. Determinación de los anticuerpos totales.....	62
2.2.3.9. Determinación de los isotipos IgG1, IgG2 e IgA.....	62
2.2.4. Seguimiento.....	63

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
IV. RESULTADOS.....	65
1. VALORACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS.....	66
1.1. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>N. meningitidis</i> C11.....	66
1.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA (CMI y CMB).....	66
1.3. CURVAS DE LETALIDAD Y SUB-CMI.....	67
1.3.1. Curva de letalidad de <i>N. meningitidis</i> frente a amoxicilina.....	67
1.3.2. Curva de letalidad de <i>N. meningitidis</i> frente a amoxicilina/clavulánico.....	68
1.3.3. Curva de letalidad de <i>N. meningitidis</i> frente a ácido clavulánico.....	68
1.3.4. Curva de letalidad de <i>N. meningitidis</i> frente a claritromicina.....	69
1.3.5. Curva de letalidad de <i>N. meningitidis</i> frente a rifampicina.....	69
1.3.6. Curva de letalidad de <i>N. meningitidis</i> frente a ciprofloxacino.....	70
1.3.7. Curva de letalidad de <i>N. meningitidis</i> frente a trovafloxacino.....	70
1.4. EFECTO BACTERICIDA.....	71
1.5. EFECTO POSTANTIBIÓTICO (EPA).....	71
2. VALORACIÓN DE LA INMUNIZACIÓN.....	72

2.1. CURVAS DE MUERTE DE <i>N. meningitidis</i>	
en cada visita.....	73
2.1.1. Visita basal.....	73
2.1.2. Visita 6 semana.....	73
2.1.3. Visita 6 mes.....	74
2.1.4. Visita 12 mes.....	75
2.2. CURVAS DE MUERTE DE <i>N. meningitidis</i>	
a lo largo de las visitas.....	76
2.2.1. Curva con suero.....	76
2.2.2. Curva con suero inactivado.....	76
2.2.3. Curva con suero + PMNs.....	77
2.2.4. Curva con suero inactivado + PMNs.....	77
2.3. Anticuerpos totales y bactericidas.....	77
2.4. Casos con RII < 25%.....	79
2.5. Isotipos IgG1, IgG2 e IgA.....	80
V. TABLAS Y FIGURAS.....	82
VI. DISCUSIÓN.....	120
1. ELECCIÓN DE LA CEPA BACTERIANA	
Y ANTIMICROBIANOS.....	121
2. VALORACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS.....	123
2.1. CMI y CMB.....	124
2.2. Curvas de letalidad y sub-CMI.....	125
2.3. Efecto postantibiótico.....	130

3. VALORACIÓN DE LA INMUNIZACIÓN.....	136
VII. CONCLUSIONES.....	149
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	152

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

CID: Coagulación intravascular diseminada.

ELISA: *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*.

EPA: Efecto postantibiótico.

ESA: Espacio subaracnoideo.

IROMP: *Iron-regulated outer membrane proteins*.

IRP: *Iron-regulated proteins*.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

LOS: Lipooligosacárido.

LPS: Lipopolisacárido.

MBP: Meningitis bacteriana piógena.

OMP: Proteínas mayores de membrana.

PBP: *Penicillin binding protein* (proteínas fijadoras de penicilina).

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

PMN: Leucocito polimorfonuclear.

PSC: Polisacárido capsular.

RIA: *Radio-Immunoassay*.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

INTRODUCCIÓN

1. NEISSERIA MENINGITIDIS

1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La enfermedad causada por *Neisseria meningitidis* es un tema de constante actualidad y un importante problema de salud pública, por su gravedad, su frecuencia y sus características epidemiológicas.

El primero que describió los síntomas clínicos de la enfermedad meningocócica fue Vieusseux en 1806 con la descripción de una epidemia de meningitis en Ginebra, denominando la enfermedad “*Fièvre cérébrale maligne non contagieuse*”. Unos años más tarde, un brote en Medfield, Massachusetts, marcó el primer brote reconocido en los Estados Unidos. Pero no fue hasta 1887 cuando en Viena, el anatomopatólogo Anton Weichselbaum, después de los trabajos de Klebs (el primero que observó cocos en el LCR de pacientes fallecidos que presentaban la enfermedad) logra identificar el microorganismo causante de la infección a partir del LCR de pacientes con meningitis. La bacteria, a la que Weichselbaum inicialmente denominó *Diplococcus intracellularis meningitidis*, en 1896 Deubner le dio el nombre de meningococo después de aislarlo por primera vez en un paciente vivo, y luego se incluyó en el género *Neisseria* (1, 2).

En los primeros años del siglo veinte se consiguieron identificar diferentes tipos de meningococos (3), y desde entonces la heterogeneidad de los mismos ha permitido un sistema de clasificación de la especie en serogrupos, serotipos, subtipos, etc.

Es el agente productor de la meningitis cerebroespinal epidémica, actualmente meningitis meningocócica, una de las enfermedades que por su morbilidad y mortalidad más temores ha despertado en la población general.

1.2. CARACTERÍSTICAS

Neisseria meningitidis es un coco gramnegativo, perteneciente al género *Neisseria*. Este microorganismo, denominado comúnmente meningococo, tiene un diámetro de 0,6 a 1,0 μm , es inmóvil y presenta tendencia a agruparse por parejas con los lados adyacentes aplanados, lo que le da un aspecto de “grano de café” al observarlo por el microscopio.

Es un organismo aerobio, catalasa y oxidasa positivo, capaz de reducir los nitritos y de oxidar la glucosa y la maltosa produciendo ácidos.

Tabla I. Características de *N. meningitidis*

CRECIMIENTO EN:		COLONIAS		PRUEBAS BIOQUÍMICAS				
Agar chocolate	Thayer Martin	Morfología	Pigmento	Gluc	Malt	Sac	Lact	Reduc nitratos
+	+	Lisas, transparentes a veces mucoides	Blanco-gris ó no pigmentadas	+	+	-	-	-

Es una especie parásita humana estricta de la mucosa de las vías respiratorias superiores. Muy exigente, solo se cultiva en medios especiales a temperaturas de 35-37 °C. Es también muy sensible a la acción de agentes externos tales como la desecación, temperaturas, antisépticos y desinfectantes.

El inicio de su desarrollo precisa medios ricos, con humedad relativa elevada (50%) y atmósfera del 5-10% de CO₂.

Para evitar la acción inhibitoria de los ácidos grasos libres presentes en los medios de cultivo (peptonas, agar) se deben añadir sustancias protectoras (suero, albúmina, almidón).

En estas condiciones, el meningococo, se desarrolla dentro de estrechos límites de temperatura y de pH (7,2-7,6).

Las colonias, lisas y transparentes de alrededor de 1,5 mm de diámetro, con el tiempo, sufren un proceso de autólisis que se puede evitar mediante la adición al medio de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}).

1.3. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Como todas las bacterias gramnegativas *N. meningitidis* posee una pared celular recubriendo la membrana citoplásmica, compuesta por una capa rígida de peptidoglicano y una membrana externa. Insertas en esa membrana externa aparecen una serie de proteínas que van a presentar capacidad antigénica, son las proteínas de membrana externa (OMP). Las de clases 2/3 definen los 20 serotipos conocidos, que se expresan por números. Una de ellas está siempre presente, siendo mutuamente excluyentes. Las de clase 1 distinguen 11 subserotipos que se conocen por números precedidos del símbolo P1.

Allí también se localiza otra de las estructuras antigénicas, el lipopolisacárido (LPS), que condiciona 12 inmunotipos distintos identificables del 1 al 12, precedidos de la letra L.

Rodeando la membrana externa aparecen polisacáridos acídicos que a veces constituyen una verdadera cápsula. Los meningococos poseen, además, proyecciones filamentosas o pili de naturaleza proteica que median la adherencia a células epiteliales de la mucosa y endoteliales en el sistema nervioso central (4) y que van a ser responsables también de la capacidad antigénica del microorganismo.

Basándose en estas estructuras antigénicas se ha desarrollado una amplia clasificación fenotípica (tabla II).

Tabla II. Calsificación fenotípica de *N. Meningitidis*^a

Sistema	Basado en:	Nº de grupos o tipos	Nombres
Serogrupos	PSC ^b	13	A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W-135. H, I, K, L
Serotipos	OMP de clase 2/3	20	1, 2a, 2b, 2c, ..., 21 ^c
Subtipos	OMP de clase 1	10	P1.1, P1.2, ..., P1.16 ^c
Inmunotipos	LPS	12	L1-L12

^a La clasificación completa de una cepa de meningococo sería, por ejemplo: B:15:P1.16:L3 (serogupo B, serotipo 15, subtipo P1.16, inmunotipo L3). Una cepa puede expresar más de un epítipo subtipo o inmunotipo específico, por ejemplo, P1.7,16 o L3,7,9.

^b Polisacárido Capsular (PSC)

^c No han sido utilizados todos los números entre 1 y 21 o P1.1 y P1.16.

1.3.1. POLISACÁRIDO CAPSULAR

Es un poliósido. Su estudio desde el punto de vista químico y serológico, ha permitido hasta el momento, diferenciar por seroaglutinación los meningococos en 13 serogrupos: A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W135, H, I, K y L (5).

Los organismos de los grupos A, B y C son los responsables de la mayor parte de las enfermedades clínicamente reconocidas, y ocasionalmente Y y W-135 (6), aunque en nuestro país los más frecuentemente encontrados son el B y el C (5).

El antígeno capsular del serogruppo A es un N-acetil-O-acetil manosamina fosfato, cuya estructura es $[\alpha(1\rightarrow6)\text{ManNAc-P}]_n$. El polisacárido B es un 2-alfa-ligado ácido N-acetil neuramínico $[\alpha(2\rightarrow8)\text{NeuNA}]_n$, y resulta inmunológicamente idéntico a un antígeno de *Escherichia coli*: el polisacárido capsular K1. El polisacárido C es un 2-9-alfa-ligado-acetil, ácido O-acetil neuramínico $[\alpha(2\rightarrow9)\text{NeuNAc}]_n$ (7).

La identificación y purificación de los antígenos polisacáridos de los grupos A, C, W135 e Y, ha dado como resultado la producción, prueba y utilización de estos materiales como vacunas con mayor o menor eficacia (8).

1.3.2. PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA (STA O "SEROTYPE ANTIGEN)

N. meningitidis posee seis clases de proteínas mayores de membrana externa (OMP). Las OMP de clase 2 y 3 definen el serotipo de la cepa (9), y la de clase 1 el subtipo (10, 11), que según algunos estudios, puede cambiar en una cepa a lo largo del tiempo (12). Estas tres proteínas son estructurales y actúan como porinas transportando moléculas fuera y dentro de la célula bacteriana.

Las proteínas de la clase 4 parecen estar presentes en todas las cepas y muy conservadas.

Las de la clase 5 muestran una elevada heterogenicidad (13) y probablemente intervengan en la adherencia (14).

La clase 6 es termomodificable y está presente en algunos meningococos del grupo A pero no en los del grupo B o el C (15).

1.3.3. LIPOPOLISACÁRIDO (ANTÍGENO LPS)

El lipopolisacárido, termoestable y de potente actividad endotóxica, carece de cadenas laterales de antígeno O, por lo que se suele denominar lipooligosacárido (LOS). Se ha demostrado una cierta variabilidad en su composición, lo que le hace útil para la clasificación serológica. Así, se han descrito 12 inmunotipos diferentes basados en el LOS (tabla II).

No se cuenta con un gran número de estudios que hagan referencia a la distribución de los inmunotipos del meningococo (16, 17, 18), pero se ha encontrado que los inmunotipos L8, L9, L10 y L11 aparecen asociados al serogrupo A, de ellos, L10 y L11 son los que aparecen con mayor frecuencia (19, 17). También se ha comprobado que los inmunotipos L1 al L9 se identifican con los serogrupos B y C. Dentro de ellos, el inmunotipo L3,7,9 parece el más prevalente, seguido de L2 y L1,8 (16, 17).

Los serogrupos, serotipos, subtipos e inmunotipos pueden variar independientemente, por lo que la caracterización serológica permite discriminar de manera eficaz diferentes cepas de meningococo.

1.3.4. PILI

Son filamentos de naturaleza proteica distribuidos por la superficie bacteriana y que están relacionados con la capacidad de adherencia del meningococo (20). Constituyen uno de los principales componentes que determinan el ataque a las células no ciliadas (21). Por tanto su presencia confiere al meningococo una mayor virulencia, hasta tal punto que esta estructura junto con la cápsula parecen ser los factores más importantes que median en la interacción con las células del endotelio y epitelio (22, 23).

1.3.5. PROTEASAS IgA1

Las cepas patógenas pueden producir estas enzimas, capaces de descomponer las IgA1 en diferentes puntos del segmento bisagra. Pero además se cree que participan en la colonización de la mucosa jugando un papel importante en la supervivencia intracelular del

meningococo, ya que parecen estar relacionadas con la prevención de la fusión de los fagolisosomas en el interior de las células (24, 25).

1.4. FACTORES DE VIRULENCIA

Todos estos antígenos actúan también como factores de virulencia. De hecho, el meningococo es capaz de evadir un muchas ocasiones, los mecanismos de defensa con los que cuenta el huésped, ya que ha desarrollado una serie de estructuras y mecanismos, tanto en superficie como en el interior, capaces de modular o desviar el sistema inmune, variando sus antígenos, utilizando factores del huésped para su protección y crecimiento, etc. En la tabla III se muestra un resumen de dichos factores.

Tabla III. Factores de virulencia de *N. meningitidis*. (Tomada de Verheult)

CATEGORIA	DESCRIPCIÓN	FUNCIÓN O MECANISMO	REF
Secreción	Proteasas IgA Blebs ^a	Eliminación IgA de secreción. Desviación de mecanismos de defensa.	26 27, 28
Estructuras de superficie	Pili PSC OMP IROMP ^b LPS	Ataque células no ciliadas (nasofaringe). Protección frente fagocitosis, reducción inmunogenicidad en niños, no induce memoria inmunológica, enmascara epítomos, etc. Variación antigénica. Captación de hierro para crecimiento. Resistencia a lisis, ruptura de barrera mucosa, etc.	29 30, 31 32 33,34 35
Uso de las defensas del hospedador	IgA	Bloqueo de la acción lítica de otras subclases de anticuerpos.	36

^a Blebs son vesículas de membrana externa que contienen lípidos, LPS, OMP y PSC. Se liberan durante el crecimiento.

^b IROMP (*Regulatory iron proteins*), proteínas reguladas por hierro.

La cápsula polisacáridica tiene un destacado papel antifagocítico así como el LPS, que también se considera un factor relevante en la virulencia, ya que no solo juega un papel importante a la hora de atravesar la barrera mucosa, sino que también actúa como diana de sialización. Se ha comprobado que la adición de ácido siálico al LPS incrementa la resistencia frente a la lisis (37, 38), y que determinadas cepas que no cuentan con estos residuos son más sensibles a la fagocitosis (39). La presencia en la membrana del meningococo de proteínas reguladas por hierro hace posible su captación a partir de la lactoferrina y transferrina humanas, participando de esta manera en la virulencia del microorganismo. Además, la existencia de pili implica que el meningococo pueda adherirse con mayor facilidad a la mucosa, donde la liberación de una IgA proteasa le permite escapar de la acción de la IgA de secreción, y así atravesar dicha estructura.

1.5. PATOGENIA

El hombre es el único hospedador conocido para *N. meningitidis* (40). Su hábitat natural lo constituye la mucosa respiratoria, principalmente la nasofaringe de personas sanas, normalmente asintomáticas, denominadas portadores (6, 41).

La transmisión de la enfermedad suele acontecer por vía respiratoria al inhalar microgotas (gotitas de Pflüge) suspendidas en el ambiente y procedentes de individuos infectados (42, 43).

Una vez que accede al hospedador, el siguiente paso a recorrer por el microorganismo es la colonización de la nasofaringe. Los daños ocasionados sobre la misma por el tabaco o infecciones víricas podrían favorecer esa colonización, pero la presencia en la bacteria de determinadas estructuras como pili, OMP de clase 5, Opa, Opc y proteasa IgA, es

determinante en el proceso (23, 14). De este modo los pili parecen ser las estructuras que determinan la adherencia del microorganismo al epitelio columnar no ciliado, ya que se ha observado que los meningococos que cuentan con esta estructura se adhieren más fácilmente que las cepas carentes de ella, y por tanto pueden ocasionar más daños (29).

Una vez colonizada la mucosa, el microorganismo la atraviesa. Stephens y Farley (44) han descrito un modelo de invasión meningocócica, en el cual, el microorganismo traspasa la mucosa y accede a las células del epitelio no ciliar donde penetra a través de un proceso de endocitosis (45) tras el cual el meningococo permanece en vacuolas fagocíticas dentro de estas células.

No se conoce con claridad la causa por la cual el microorganismo pasa al torrente circulatorio, se disemina a otros lugares y produce enfermedad, pero este hecho se relaciona con el estado general del huésped, unos niveles bajos de anticuerpos, deficiencias en el sistema de complemento, etc.

N. meningitidis es capaz de sobrevivir y proliferar en el torrente circulatorio gracias a la presencia de factores de virulencia que le permiten evadir los mecanismos de defensa del hospedador. La cápsula polisacárida, tiene un importante papel antifagocítico y protege al microorganismo frente a la lisis mediada por el complemento, mientras que la potente endotoxina interviene en el desarrollo de diversas manifestaciones clínicas. *N. meningitidis* no produce exotoxinas específicas, pero libera vesículas de endotoxinas que tienen importancia en la virulencia.

Además se ha comprobado que esta bacteria cuando se encuentra, como ocurre *in vivo*, en medios con falta de hierro (necesario para su crecimiento), es capaz de sintetizar proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMP), cuya finalidad es obtener el metal a

partir de la lactoferrina y transferrina humanas (46). Esta capacidad parece estar relacionada con su virulencia, puesto que las Neisserias comensales, aunque producen proteínas que se unen a esta enzima, no son capaces de obtener hierro de ellas (33).

2. ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA

A pesar de los adelantos en el conocimiento de la patogenia, la epidemiología, el diagnóstico y el tratamiento, pocas infecciones producen la tensión médica y la alarma social que se desatan al detectarse algún caso de enfermedad meningocócica en la comunidad. Ya desde que Vieusseux en 1805 observara su sintomatología y la denominara “*Fièvre cérébrale maligne non contagieuse*”, esta enfermedad ha sido objeto de numerosas investigaciones, además, la forma brusca de su aparición y su rápida extensión hasta adquirir una distribución mundial ha dado lugar a distintas teorías que tratan de explicar su origen.

Con el descubrimiento de su agente causal en 1887 realizado por Anton Weichselbaum a partir del LCR de pacientes con meningitis se produjo un gran avance en el conocimiento de la enfermedad.

La meningitis es una respuesta inflamatoria de las meninges, ventrículos cerebrales y líquido cefalorraquídeo (LCR) contenido en ellos. La mayoría de las meningitis son debidas a una infección del espacio subaracnoideo (ESA) o de estructuras contiguas, aunque también puede ser de etiologías no infecciosas.

De forma general se pueden clasificar en dos grupos:

- Meningitis bacterianas piógenas (MBP)
- Meningitis asépticas

Ambas conllevan conductas diagnósticas y terapéuticas distintas. No obstante, en la práctica clínica ambos grupos no siempre son fácilmente diferenciables, dado que puede existir un solapamiento importante en las manifestaciones clínicas y en los parámetros bioquímicos del LCR.

La mayoría de los episodios de meningitis bacteriana piógena están producidos por un reducido grupo de microorganismos, variando su frecuencia con la edad y circunstancias clínicas del paciente. Durante los tres primeros meses de vida los responsables de la aparición de la enfermedad son los estreptococos del grupo B, bacilos gramnegativos como *Escherichia coli* y, aunque con menor frecuencia, el bacilo grampositivo *Listeria monocytogenes*. *Haemophilus influenzae* tipo b, con una tasa de incidencia en la comunidad de Madrid del 20,03% (5), es la causa más importante de MBP en niños menores de 5 años. *N. meningitidis* es la bacteria que con mayor frecuencia aparece en niños, adolescentes y adultos jóvenes, y *Streptococcus pneumoniae* en adultos mayores de 30 años y en pacientes con factores de riesgo (alcoholismo, inmunodeficiencias, etc.) (5).

Las manifestaciones clínicas varían desde una bacteriemia transitoria hasta cuadros fulminantes que conducen a la muerte en escasas horas, a pesar de instaurar tratamiento adecuado. Son consecuencia de la propia inflamación meníngea y de los cambios fisiopatológicos que ocurren a nivel cerebral. Incluyen fiebre, cefalea, signos de irritación meníngea y disfunción cerebral. También son comunes las náuseas, vómitos, mialgias y fotofobia. Los denominados signos meníngeos (rigidez de nuca, signos de Kernig- intenso dolor y resistencia a extender la rodilla estando el muslo flexionado- y de Brudzinski- provocar una flexión rápida de la cabeza que induce una flexión inmediata de extremidades inferiores en cadera y rodillas-) están ausentes hasta en el 50% de los casos.

Una característica de la meningitis meningocócica es la aparición de petequias cutáneas diseminadas, más frecuentemente en tronco y extremidades superiores. Las petequias se correlacionan con el grado de trombocitopenia y clínicamente son importantes como indicador de las complicaciones hemorrágicas del cuadro de coagulación intravascular diseminada (CID) que a veces se produce.

2.1. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de certeza de la infección meningocócica se basa en el aislamiento de *N. meningitidis* a partir del LCR, sangre, líquido sinovial, pleural o pericárdico. Las dos primeras son las más utilizadas.

El LCR típico de una MBP es hipertenso, turbio o claramente purulento y con un número ≥ 2000 células/ μl , con predominio de PMN, proteínas ($> 200\text{mg/dl}$) e hipogluorraquia (glucosa en LCR/glucosa plasmática $< 40\%$). Un paciente con un LCR como el descrito anteriormente tendrá una probabilidad del 99% de presentar una MBP.

Los estudios microbiológicos a realizar son (47):

- Tinción de Gram. Se podrán observar frecuentemente diplococos gramnegativos y numerosos leucocitos polimorfonucleares (PMN).
- Cultivo. Los meningococos crecen en los medios de cultivo enriquecidos habituales no selectivos y su crecimiento se favorece con una atmósfera enriquecida con CO_2 . El agar columbia es de los medios más utilizados. Tras comprobar que se trata de diplococos gramnegativos que dan positiva la reacción de la oxidasa, se realiza la identificación bioquímica basada en la utilización de

azúcares y la tipación de grupo mediante aglutinación en placa con antiseros específicos.

- Detección de antígeno capsular. Existen diversas técnicas que pueden ser útiles cuando el paciente ha sido tratado previamente con antibióticos que impiden el crecimiento del microorganismo. Su uso se debe restringir a aquellos casos que teniendo una celularidad elevada en LCR no se observan microorganismos en la tinción de Gram.
- Otras técnicas. Como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), de elevada sensibilidad y especificidad, que podría tener utilidad en pacientes que hubieran recibido tratamiento antimicrobiano previo.

Las radiografías de tórax, cráneo y senos paranasales permiten el diagnóstico de focos primarios. La resonancia magnética de cráneo es útil en la detección de complicaciones o de focos parameningeos, estando indicada su realización en aquellos pacientes con fiebre persistente más allá de 3 ó 4 días después de haber iniciado tratamiento antimicrobiano.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

Las infecciones causadas por *N. meningitidis* siguen constituyendo un importante problema de salud mundial. La tasa de portadores en períodos no epidémicos es del 5-30% (42). En Francia se han encontrado tasas del 10% en menores de 14 años y del 30% en el grupo de 15 a 20 años (5). Un estudio realizado en nuestro país, entre 1991 y 1992, encontró una tasa de portadores en población escolar, entre 6 y 14 años, del 2,3% (48).

La tasa de letalidad documentada para la meningitis es del 5%, aumentando hasta el 20% cuando en la presentación está implicada la forma de sepsis (enfermedad invasora

meningocócica) (5). Los niños menores de 5 años son los que muestran las tasas de incidencia más elevadas, seguidos del grupo de adolescentes, entre 15 y 19 años (49).

N. meningitidis es la única bacteria conocida con capacidad de producir grandes epidemias de meningitis y sepsis, existiendo marcadas diferencias en el potencial epidémico de los distintos serogrupos. El serogrupo A produce epidemias en países subdesarrollados con tasas de 500 casos por cada 100.000 habitantes. El serogrupo B ocasiona brotes epidémicos en países industrializados con una tasa de infección de 50 a 100 casos por 100.000 habitantes. El serogrupo C afecta a todos los países desarrollados y no desarrollados con tasas de infección de hasta 500 casos por cada 100.000 habitantes (50).

En algunos países se ha observado, en los últimos años, un relativo aumento del serogrupo C, asociándose cepas de este serogrupo a un sustancial incremento de la incidencia por enfermedad meningocócica, más que una simple redistribución de serogrupos. Este predominio del serogrupo C puede ser un fenómeno cíclico.

En España, aunque las infecciones han sido tradicionalmente producidas por el serogrupo B, según la información suministrada por el Laboratorio de Referencia de Meningococos del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud "Carlos III", se está observando un cambio en el serogrupo del meningococo predominante. En la actual década se ha pasado de una situación en la que el serogrupo B representaba entre un 60%-75% de todos los casos y el C entre un 25%-30%, a una nueva situación. Así, en 1996, las cepas del serogrupo C representaron un 58,9% y las del serogrupo B un 39%. Esta situación de aumento de cepas de serogrupo C, es generalizada en todas las comunidades autónomas (5). Las infecciones producidas por el resto de los serogrupos constituyen menos del 1 por 100.

La enfermedad meningocócica se caracteriza por presentar picos epidémicos de forma cíclica (ondas epidémicas) cada 10 ó 20 años, con una duración aproximada de 3 años. Los periodos interepidémicos están sufriendo una reducción progresiva, manteniéndose durante los mismos un nivel elevado de endemia. La tasa de incidencia de la enfermedad meningocócica en España en 1996 fue de 3,5 casos por 100.000 habitantes (49), lo que parece indicar que nos encontraríamos en un periodo interepidémico.

Por otra parte la enfermedad muestra un claro patrón estacional (51), presentándose en nuestro país el mayor número de casos (42,1%) al final del invierno e inicio de la primavera (de enero a marzo) y la incidencia más baja (11,1%) en los meses de verano y otoño (entre julio y septiembre) (5)

La infección afecta principalmente a niños, siendo la causa más importante de meningitis purulenta entre los 6 meses y los 5 años de edad. La enfermedad se transmite por vía respiratoria mediante gotitas, por lo que para padecerla se requiere un contacto íntimo y ausencia de anticuerpos protectores. Estas circunstancias acontecen principalmente en el núcleo familiar, donde el riesgo de infección es mil veces superior al de la población en general. Otras veces afecta a grupos de población cerrados tales como guarderías, colegios o núcleos militares.

2.3. TRATAMIENTO. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Los primeros estudios sobre el tratamiento de la enfermedad meningocócica aparecieron en 1937 con las sulfamidas, que constituyeron el tratamiento de elección durante un cuarto de siglo, hasta que en 1963 se presentó en California la primera epidemia por meningococos resistentes. En nuestro país, la utilización de las sulfamidas como agente

quimioproláctico en la década de 1960, de forma indiscriminada y masiva, originó la aparición progresiva de resistencias (que en los últimos años presentan porcentajes similares, con cifras superiores al 80%) (52). Estas sulfamidas dejaron de emplearse en el tratamiento de la enfermedad y se sustituyeron por rifampicina en la profilaxis (53), fármaco que se sigue utilizando en la actualidad (54). La incidencia de cepas resistentes a rifampicina en portadores de meningococo varía de 0 a 27% según los autores. La sensibilidad a la rifampicina en España es del 96,2% (55, 56) y durante el periodo 1989-1992 solamente se detectaron tres cepas de meningococo con una CMI de 2 mg/l (resistencia moderada a la rifampicina) en los aislamientos de pacientes con enfermedad meningocócica (52).

La utilización de la penicilina a partir de 1944, supuso la posibilidad de un tratamiento muy eficaz de las infecciones causadas por el meningococo, y a pesar de que *N. meningitidis* es una de las bacterias menos problemáticas a la hora del desarrollo de resistencias, la aparición de cepas de meningococos de sensibilidad disminuida frente a este antibiótico es un hecho en España desde 1985 (57). La frecuencia de cepas aisladas con estas características ha ido aumentando también en numerosos países (58, 59, 60), con CMIs que van desde 0,1 mg/l a 1,28 mg/l (61). Ello ha originado un problema terapéutico importante que hasta el momento se ha solucionado con las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima y ceftriaxona). Estudios realizados por diversos autores (62, 63) muestran a estos fármacos como una buena alternativa en la terapia de la meningitis meningocócica, ya que las CMI son muy bajas tanto para los meningococos sensibles como para los resistentes a penicilina.

Desde el comienzo de la utilización del cloramfenicol en 1951 en el tratamiento de esta enfermedad se evidenciaron graves efectos secundarios, que unidos a la aparición de

resistencias (64), han limitado su uso y lo han relegado como opción en el tratamiento de pacientes alérgicos a los betalactámicos.

2.4. INMUNIDAD

La inmunidad frente a las infecciones causadas por *N. meningitidis* está basada en la producción de anticuerpos grupo específicos opsonizantes, que facilitarían la fagocitosis, y bactericidas, que actuarían previa fijación del complemento. La mayor parte de los adultos los poseen, y así se explicaría la especial incidencia de esta infección en el período comprendido entre la pérdida de la protección inmunológica materna (6 meses), y la madurez del propio sistema inmunitario (2 años).

En relación con los antígenos capsulares se ha demostrado que los polisacáridos de los grupos A y C se comportan como buenos antígenos induciendo la formación de anticuerpos bactericidas, responsables de la inmunidad adquirida, que es siempre grúpospecífica. Por el contrario, el polisacárido del grupo B no induce la producción de anticuerpos, ya que su estructura es biológicamente similar y a la de los gangliósidos, con los que presenta una inmunidad cruzada (31).

Existen factores individuales que predisponen a infecciones masivas por *N. meningitidis*. Así, parece ser que el déficit en los últimos factores que forman parte del sistema de complemento (C5 a C8) está relacionado con una mayor susceptibilidad a las infecciones por el meningococo (65). Esto sugiere que una parte importante de la defensa del huésped frente a estas bacterias se basa en su lisis en el plasma mediada por el complemento (66). También la alteración en la properdina y deficiencias en las IgG₂ e IgG₄ se han relacionado con esta susceptibilidad.

Los adultos pueden adquirir la infección cuando toman contacto con serogrupos frente a los que no poseen anticuerpos específicos.

Los anticuerpos protectores se adquieren mediante la infección subclínica o asintomática, o mediante el estado de portador. También se postula la posibilidad de adquirir anticuerpos protectores por contacto con otros antígenos cruzados de bacterias que forman parte de la flora microbiana normal. Así, los portadores nasofaríngeos de *Neisseria lactamica* inducen la aparición de anticuerpos protectores frente a serogrupos patógenos, al existir reacciones serológicas cruzadas (20).

Por otro lado, se ha observado que, en las infecciones naturales por meningococos pertenecientes a un serogrupo, se podía encontrar en el suero anticuerpos bactericidas no sólo para el mismo grupo, sino frente a otros serogrupos. La explicación de estas divergencias la encontramos, posiblemente, en los anticuerpos producidos frente al antígeno proteico de la membrana externa, ya que la infección por una cepa de meningococos da lugar a anticuerpos frente al polisacárido capsular y a la proteína de membrana externa. Mientras que la inmunidad en los primeros, por ser grupo específica, afectaría a todos los meningococos del mismo serogrupo, los segundos por su tipoespecificidad la extenderían a todos los meningococos del mismo serotipo, que por pertenecer a diferentes serogrupos, explicaría la inmunidad de amplia cobertura que se presenta.

Estos fenómenos también se han observado con los meningococos menos patógenos, pues en el suero de portadores de meningococos no agrupables se han encontrado anticuerpos frente a estos, y en proporción variable también frente a meningococos de los grupos patógenos (A, B, y C).

Todos estos datos indican que la colonización de la población por meningococos pertenecientes a los grupos más patógenos e incluso por *N. lactamica* y otras bacterias que cuentan con antígenos relacionados, como es el caso del antígeno K1 de algunas cepas de *E. coli*, contribuye a crear una inmunización natural de base, frente a la mayor parte de los meningococos de los grupos patógenos.

3. VACUNAS ANTIMENINGOCÓCICAS

Los estudios sobre vacunas en humanos se iniciaron durante el primer tercio de este siglo utilizando suspensiones de microorganismos enteros (Tabla IV). La aparición de las sulfamidas, y posteriormente de la penicilina, propició la paralización de las investigaciones a partir de la década de 1940. Se reiniciaron en los años 1960, tras la detección de los primeros casos de resistencia a los antibióticos.

Los primeros intentos de purificación de los polisacáridos capsulares del meningococo para la síntesis de una primera vacuna resultaron fallidos (67), y la inmunización frente a *N. meningitidis* no comenzó a ser una realidad hasta la publicación de las conclusiones de Gotschlich y colaboradores a finales de los años 1960 (68). De este modo, la identificación de la inmunogenicidad de los polisacáridos capsulares, su posterior purificación y la necesidad de utilizar los de peso molecular superior a 100 kD para obtener una eficacia suficiente (69), sentaron las bases para las actuales vacunas contra el meningococo.

Tabla IV. Evolución de las vacunas antimeningocócicas.

AÑOS	COMPOSICIÓN	AUTORES	EFICACIA
1907/1930	Bacterias enteras	Davies, Sophian, Dopter	Limitada por toxicidad
1940	PSC A	Kabat	
1970	PSC A y C purificados	Gotschlich	Limitada a > 2 años
1980	PSC A, C, Y, W-135	Farguhar, Griffiss, Hankins	Limitada a > 2 años

Una vacuna antimeningocócica ideal debería ser:

- Inmunógena y eficaz para todos los grupos de edad, incluyendo a los lactantes a partir de los 2 meses de vida.
- Inmunógena frente a todos los serogrupos, serotipos, subserotipos e inmutipos de *N. meningitidis*.
- Arreactógena.

Además este preparado idóneo tendría que poder condicionar los mecanismos inmunitarios fisiológicos que un huésped normal expresa frente a la infección natural, para lograr la fagocitosis y la destrucción del microorganismo invasor.

3.1. TIPOS DE VACUNAS ANTIMENINGOCÓCICAS

3.1.1. VACUNAS DE POLISACÁRIDOS CAPSULARES

Las vacunas frente a *N. meningitidis* disponibles en la actualidad, resultan efectivas frente a los serogrupos A, C, Y y W-135 (70). Estas vacunas están constituidas por polisacáridos capsulares purificados a partir de estos cuatro serogrupos. La eficacia de las mismas ha sido evaluada en un gran número de estudios (71, 72, 73, 74, 75, 76), en los que se han ensayado los componentes por separado, la combinación de los polisacáridos de los serogrupos A y C, y más recientemente la vacuna tetravalente, que reúne los cuatro serogrupos mencionados.

Estas vacunas polisacarídicas son capaces de inducir una protección que se incrementa con la edad del individuo y que varía con el serogrupo (77). En relación con su eficacia clínica, por grupos de edad, está documentado:

- En niños mayores y adultos, una eficacia clínica mayor del 85% (78, 79).
- En niños menores de 5 años, una eficacia clínica del 70% (78).
- En niños de 2-3 años, del 55% (80).
- En niños menores de 2 años la vacunación no se ha mostrado eficaz (79).

Por otro lado, no inducen memoria inmunológica (72, 73, 74, 75, 76, 81), ya que los polisacáridos de la cápsula actúan como antígenos independientes de las células T.

La inmunización rutinaria con la vacuna combinada A, C no está recomendada, salvo en casos de epidemia o alta endemia, ya que el grupo C es poco inmunogénico en niños

menores de 2 años, especialmente por debajo de los 18 meses, grupo que constituye el de mayor riesgo. La revacunación no produce efecto booster y la protección en niños pequeños es de corta duración (79).

Donde si está indicada la vacunación rutinaria (82) es en grupos de alto riesgo, como individuos con deficiencias genéticas en la properdina o en alguno de los factores terminales de la cascada del complemento (C5, C6, C7, C8), asplenia anatómica o funcional, enfermedad de Hodgkin y otras neoplasias hematológicas o deficiencias de tipo humoral combinado; en personas que viajen a zonas hiperendémicas o epidémicas de enfermedad meningocócica ocasionada por alguno de los serogrupos representados en estas vacunas. También se debe considerar la vacunación en trabajadores de laboratorio que habitualmente estén expuestos a soluciones de *N. meningitidis* que puedan convertirse en aerosoles.

Por tanto, el uso de estas vacunas queda restringido, por regla general, a los grupos de edad mayores de 2 años expuestos a riesgo de infección por los meningococos de los serogrupos cuyos polisacáridos capsulares se hallan representados en los preparados existentes.

3.1.2. VACUNAS CONJUGADAS

Con objeto de superar las desventajas intrínsecas de las vacunas polisacáridicas y lograr una protección suficiente en lactantes y niños pequeños, se han desarrollado vacunas que conjugan polisacáridos capsulares del meningococo con proteínas, análogamente a como se ha procedido con las vacunas conjugadas frente a *Haemophilus influenzae* tipo b (83). Conjugando los polisacáridos con proteínas cambia el carácter antigénico de estos, y pasan de ser linfocitos T-independientes a T-dependientes (84). Por lo tanto se puede inducir memoria

inmunológica (85). Estas vacunas conjugadas resultarían más inmunogénicas ya que serían capaces de conferir inmunidad desde los primeros meses de vida. Los resultados que se están obteniendo son alentadores (86, 87, 88), y de hecho contamos ya con este tipo de vacuna en la lucha contra la enfermedad meningocócica.

3.1.3. VACUNA FRENTE AL SEROGRUPO B

El polisacárido capsular del serogupo B de *N. meningitidis*, hasta ahora el que ha predominado en nuestro medio (89), no promueve respuestas inmunitarias equivalentes a las que consigue el incluido en las vacunas antimeningocócicas A y C. Su estructura polisacárida, biológicamente similar a la de los gangliósidos humanos (31, 90), lo inhabilita como inductor de inmunidad.

Como respuesta a la urgente necesidad de nuevas vacunas y para subsanar este problema, se intenta provocar la inmunogenicidad mediante la utilización de antígenos proteicos de la membrana externa, y la mayor parte de las investigaciones están dirigidas hacia el uso de componentes subcapsulares tales como: las proteínas mayores de membrana (OMP) de clases 1, 2, 3, 4 y 5, la proteína OPC (*opacity protein C*), la lipoproteína H.8 y las proteínas fijadoras de hierro (IROMP, *iron regulated proteins*).

Como ha quedado reflejado en diversos estudios, las OMP parecen ser inmunogénicas tanto en adultos como en niños, con una eficacia del 57% al 83% (91) y capaces de aumentar la fagocitosis y de inducir anticuerpos bactericidas (92, 93, 94). Las IROMP provocarían la síntesis de anticuerpos frente a esta proteína, inhibiendo su función captante de hierro (necesario para el crecimiento bacteriano) a partir de la ferritina y la lactoferrina. La

utilización de LPS detoxificados actuaría, más que sintetizando anticuerpos, neutralizando la actividad endotóxica de *N. meningitidis* (95, 70).

Todos estos componentes, aisladamente o, sobre todo, en forma de preparados multivalentes, incluyendo o no polisacáridos no capsulares, se están utilizando para el diseño de nuevas vacunas contra el meningococo del grupo B.(8).

4. ANTIMICROBIANOS

El ideal terapéutico perseguido desde la aparición de los primeros antibióticos, ya fue planteado por el fundador de la quimioterapia, Paul Ehrlich (1913), quien postuló (96) que la eficacia de un agente quimioterápico debe basarse en los siguientes puntos:

1. Ser activo contra los microorganismos.
2. Ser fácilmente absorbible por el cuerpo.
3. Ser activo en presencia de tejidos o fluidos corporales.
4. Poseer un bajo grado de toxicidad y, por tanto, un alto índice terapéutico.
5. No permitir el desarrollo de resistencias en los microorganismos.

Desde entonces, el avance en este campo ha sido considerable. Pese a ello, todavía no se ha podido encontrar el antibiótico ideal que cumpla todos los postulados arriba mencionados, con lo que la investigación en este campo sigue estando vigente. Además, la aparición de nuevas infecciones y los fenómenos de resistencia a los antimicrobianos en uso, ha supuesto una mayor búsqueda de nuevas moléculas o la recuperación de otras, y que el mundo de la antibioterapia sea, hoy en día, un tema de máxima actualidad.

4.1. BETALACTÁMICOS

El término β -lactámico incluye a todas las moléculas que contienen en su estructura un anillo β -lactámico. Estos compuestos pueden ser naturales o semisintéticos, con actividad principalmente bactericida, de corto, medio o amplio espectro.

Dentro de este grupo encontramos penamas o penicilinas, penemas, carbapenemas, clavamas, cefemas y cefamicinas, oxacefemas u oxicefemas y trienemas. De todas ellas nos centraremos en las penicilinas y en las clavamas, donde se encuadran amoxicilina y ácido clavulánico, respectivamente.

4.1.1. PENICILINAS

Resultan de la condensación de un anillo betalactámico (anillo principal) y otro de tiazolidina (anillo secundario), compuesto fundamental denominado ácido 6-amino-penicilánico (6-APA) del que derivan el resto.

4.1.1.1. Mecanismo de acción.

Las penicilinas, al igual que el resto de los β -lactámicos, interfieren en la formación de la pared celular bacteriana al impedir la transpeptidación. Como consecuencia de la interferencia en la formación de la pared celular, esta queda laxa, incompleta y muy susceptible al estallido y ruptura debido a las altas presiones osmóticas ejercidas por el citoplasma (97).

En las bacterias gramnegativas la penetración de las penicilinas ocurre a través de la membrana externa y del peptidoglicano gracias a poros OMPf y OMPc, ya que en estos microorganismos, la membrana externa actúa como una barrera hidrófoba, impidiendo el paso de sustancias hidrofílicas (98). Una vez recorrido el espacio periplásmico se fijan sobre el

lugar de acción. Las dianas celulares de estos antimicrobianos son las enzimas que catalizan la síntesis de las uniones cruzadas de peptidoglicano de la pared celular. Estas enzimas son las proteínas fijadoras de penicilina (*penicillin binding protein* o PBP), a las que los compuestos β -lactámicos presentan diferentes afinidades, así amoxicilina tiene una elevada afinidad por PBP1a, 1b y 2, y algo menor por la PBP 3 (99).

4.1.1.2. Mecanismos de resistencia.

La resistencia a las penicilinas puede ser debida a varios mecanismos:

1. Alteraciones en la permeabilidad celular. Las alteraciones se producen en porinas o en lipopolisacáridos asociados a la membrana externa, impidiendo el paso de las moléculas. Este mecanismo ha sido ampliamente descrito en bacterias gramnegativas (100, 101, 102).
2. Modificaciones de la diana. Pueden producirse mutaciones en las PBPs que hacen disminuir la afinidad de los β -lactámicos por estas proteínas. Este parece ser el mecanismo de resistencia más habitual que presenta el meningococo a las penicilinas. (103, 104).
3. Producción de β -lactamasas. Estas enzimas, sintetizadas por las bacterias, hidrolizan el enlace amida cíclico del núcleo de la penicilina, lo que conduce a la producción de peniciloatos sin actividad bactericida. Afortunadamente, las cepas de meningococo productoras de β -lactamasas son poco frecuentes en nuestro país (105, 106).
4. Tolerancia. Este fenómeno se ha observado para algunos β -lactámicos, y se refleja por un aumento de la CMB aunque la CMI permanece constante. Las bacterias se inhiben en su crecimiento pero el antibiótico no produce acción bactericida (107).

4.1.1.3. Farmacocinética

La absorción oral varía mucho para las diferentes penicilinas, pero las concentraciones séricas máximas se alcanzan 1-2 horas después de la ingestión. Difunden fácilmente, alcanzando valores terapéuticos en los líquidos extracelulares y en la mayor parte de los tejidos corporales a excepción del humor acuoso, la próstata y las meninges no inflamadas. No penetran intracelularmente ni en el interior de los polimorfonucleares. La unión a proteínas (especialmente a la albúmina) puede oscilar entre el 17% y el 97%, dependiendo de que penicilina se trate, y tienen una vida media corta que fluctúa entre los 30-70 minutos.

Su eliminación es, principalmente, por vía renal mediante filtración glomerular y secreción tubular (97, 108)

4.1.1.4. Indicaciones

Su administración está indicada, siempre y cuando no existan resistencias, para el tratamiento de infecciones cutáneas y de tejidos blandos (heridas, absesos, etc.), infecciones respiratorias (bronquitis, neumonías, etc.), infecciones otorrinofaringológicas (faringitis, otitis, sinusitis, etc.), infecciones genitourinarias (gonococia, sífilis, cistitis, etc.), infecciones osteoarticulares, endocarditis, septicemias, meningitis, salmonelosis, fiebre reumática, y demás infecciones causadas por microorganismos sensibles a ellas (97, 108).

4.1.2. CLAVAMAS

Derivados del ácido 6-aminopenicilánico. Su nombre deriva del primer compuesto descrito, denominado ácido clavulánico, obtenido a partir de un cultivo de *Streptomyces clavuligerus* (109).

El ácido clavulánico, muestra una baja actividad antibacteriana frente a la mayoría de los microorganismos, por lo que, como agente único no resulta clínicamente útil. Sensibles al ácido clavulánico se muestran pocas especies bacterianas, pero entre ellas se encuentra *N. meningitidis* (110).

A pesar de tener poca actividad antibacteriana, es un potente inhibidor de las betalactamasas producidas por muchos microorganismos. Su acción bloqueante de estas enzimas es irreversible y progresiva, de forma que, pequeñas concentraciones del fármaco impiden la acción inactivante de las mismas sobre las penicilinas no resistentes a ellas, con lo que su asociación resulta intensamente sinérgica (111).

4.1.2.1. AMOXICILINA/ÁCIDO CLAVULÁNICO

La amoxicilina es una penicilina semisintética de amplio espectro que muestra un elevado nivel de actividad bactericida frente a una amplia gama de bacterias grampositivas y gramnegativas, pero que es inestable ante betalactamasas bacterianas (112, 113, 114). El ácido clavulánico, como ya se ha señalado, es un inhibidor progresivo de las betalactamasas bacterianas (115, 116) y es capaz de proteger a la amoxicilina de su destrucción *in vivo* e *in vitro* (117, 118). Existen fórmulas comerciales en uso que reúnen la amoxicilina y la sal potásica del ácido clavulánico, en proporciones de 2:1, 4:1 y 10:1.

4.1.2.1.1 Estructura química

Amoxicilina es el nombre con el que se conoce al trihidrato del ácido 6((amino) 4-hidroxifenil) acetil) amino)-3,3-dimetil-7-oxo-tia-1-azabicyclo (3.2.0.) heptano 2 carboxílico (figura 1).

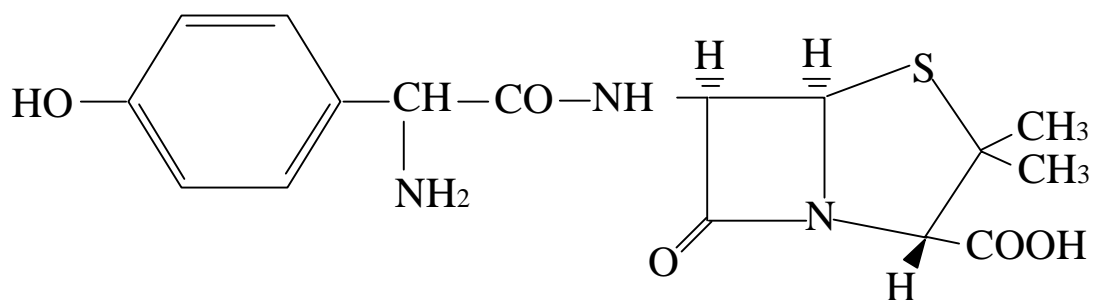


Figura 1. Estructura química de amoxicilina.

La sal potásica del ácido Z - (2R,5R) - 3 (2-hidroxiethyliden) - 7 - oxo - 4 - oxa - 1-azabicyclo (3.2.0.) - heptano - 2 - carboxílico, es conocida como la sal potásica del ácido clavulánico (figura 2).

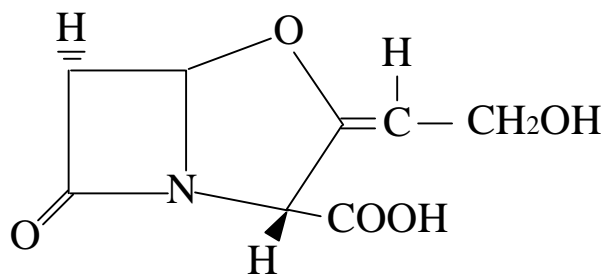


Figura 2. Estructura química del ácido clavulánico.

4.1.2.1.2. Actividad antibacteriana.

El ácido clavulánico por si solo muestra un nivel relativamente bajo de actividad antibacteriana, tanto frente a las bacterias grampositivas como a las gramnegativas. En cepas productoras de betalactamasas (tanto grampositivas como gramnegativas), la presencia de ácido clavulánico aumenta significativamente la sensibilidad de esas cepas a la amoxicilina (119, 120).

4.1.2.1.3. Indicaciones

Amoxicilina/ácido clavulánico está indicado en el tratamiento de los procesos infecciosos producidos por microorganismos productores de betalactamasas y de los procesos infecciosos mixtos producidos por microorganismos sensibles a la amoxicilina y por microorganismos productores de betalactamasas, tales como infecciones del aparato respiratorio, otitis media, infecciones genitourinarias, infecciones de la piel, tejidos blandos y óseos e infecciones intraabdominales.

4.1.2.1.4. Farmacocinética

La farmacocinética de amoxicilina y ácido clavulánico es parecida, alcanzándose niveles séricos máximos de ambos, alrededor de una hora después de su administración. Tiene una absorción oral prácticamente completa. La unión a proteínas es baja, 18% y 25% respectivamente, y la principal vía de eliminación es la excreción renal.

4.2. QUINOLONAS

Son sustancias derivadas del ácido nalidíxico que presentan en común una estructura central constituida por un anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, de forma abreviada: 4-quinolona.

Existen varias clasificaciones propuestas para esta familia de fármacos: la química, la biológica y la de generaciones (121). La química es la más compleja y se basa en el tipo de estructura asociada al núcleo básico. De este modo, las diferencias estructurales entre las distintas quinolonas radican tanto en el número y posición de los átomos de nitrógeno como en las cadenas laterales y la presencia de flúor en su molécula. La introducción de un átomo de flúor en posición 6 aumenta su actividad antibacteriana y amplía su espectro de acción, incluyendo tanto gramnegativos como grampositivos. A este tipo de quinolonas fluoradas pertenecen ciprofloxacino y trovafloxacino.

4.2.1. Mecanismo de acción.

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de las funciones de la girasa bacteriana (122, 123), enzima que cataliza el superenrollamiento negativo del ADN (124, 125, 126, 127). Así, las quinolonas al unirse a las subunidades de la girasa impiden la rotura y el sellado de la cadena de ADN de doble hélice, estabilizándola y evitando que la enzima intervenga en la formación de giros adicionales, con lo que el ADN, demasiado expandido, no tiene suficiente espacio dentro del microorganismo, hecho que provoca que la bacteria se elongue y posteriormente se destruya (125, 128).

4.2.2. Mecanismo de resistencia

Los mecanismos de adquisición de resistencia a las quinolonas que se han encontrado son fundamentalmente tres:

1. Modificación enzimática de las subunidades de la ADN-girasa. Es el principal, y se debe a la aparición de mutaciones en los genes que codifican para estas subunidades (129).
2. Alteración de la permeabilidad de las porinas. Por mutaciones en los genes que codifican para estos poros, probablemente debido a una alteración de los lipopolisacáridos de la pared (130), impidiéndose la entrada de estos compuestos dentro de la bacteria.
3. Aumento de la expulsión del antibiótico mediante bombas de flujo. A este mecanismo de expulsión activa cada vez se le está concediendo más importancia (131, 132).

Varios de estos mecanismos pueden coexistir en la misma bacteria.

4.2.3. Indicaciones.

La utilidad clínica de las quinolonas, sobre todo las modernas fluorquinolonas, es muy amplia, pudiéndose emplear en la mayoría de las infecciones: urinarias, tanto de vías como parenquimatosas, gastrointestinales, osteoarticulares, respiratorias, otorrinolaringológicas, cutáneas y de tejidos blandos, de transmisión sexual y otras (121, 133).

2.2.4. CIPROFLOXACINO

4.2.4.1. Estructura química

Se trata del ácido 1-ciclopropil-6-flúor-1,4-dihidro-4-oxo-7(1-piperazinil)3-quinolein carboxílico (figura 3). Es una fluorquinolona de segunda generación de origen sintético con estructura de 4-quinolona.

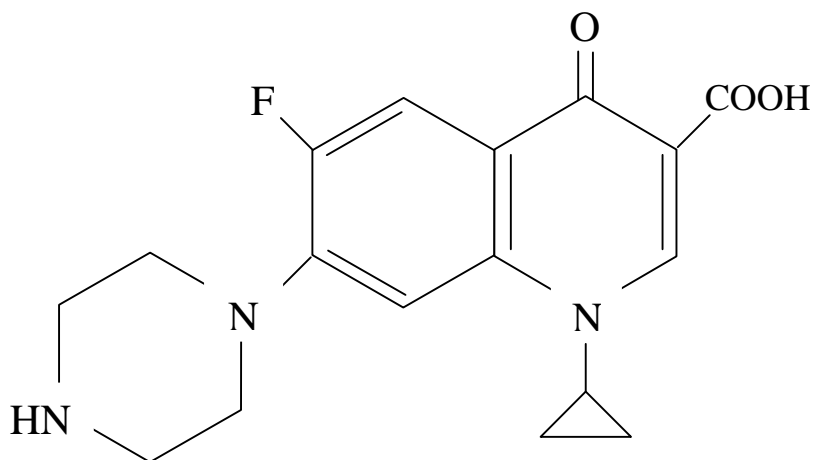


Figura 3. Estructura química de ciprofloxacino.

4.2.4.2. Actividad antibacteriana

Ciprofloxacino posee un amplio espectro de actividad (134) que abarca casi todos los gérmenes gramnegativos, principalmente *Neisseria* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*, y muy especialmente al grupo de las enterobacterias. Su acción incluye también gérmenes grampositivos como *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Rickettsia* y *Mycobacterium* (134).

Actúa tanto en fase de crecimiento exponencial como en fase estacionaria, disminuyendo su potencia bactericida a pH ácido y no influyendo las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis (135).

4.2.4.3. Farmacocinética

La absorción tras su administración por vía oral es buena (75-80%) y se produce con rapidez alcanzando la C_{max} entre 1 y 1,30 horas después (136, 137). Por vía intravenosa la concentración sérica disminuye rápidamente (aproximadamente a la cuarta parte de la dosis)

en los primeros 30 minutos (138). Su distribución en estado estacionario oscila entre 2 y 3 l/Kg, por tanto, las concentraciones en los diferentes tejidos orgánicos son elevadas. La unión a proteínas es baja, 20-28%. Se excreta por orina en un 80-85%, lo cual explica por qué en ella se alcanzan concentraciones muy elevadas.

4.2.5. TROVAFLOXACINO

4.2.5.1. Estructura química

Es una fluoroquinolona sintética de tercera generación con estructura 7-(3-azabicyclo (3,1,0) hexil)-naftiridona. Presenta *in vitro* una mayor eficacia con respecto a las quinolonas de segunda generación frente a cocos grampositivos aerobios y sobre todo frente a las bacterias anaerobias más importantes (139). Esto se debe a la adición de un sustituyente 3-azabicyclo y un grupo difluorofenil en posiciones C-7 y N-1, respectivamente (figura 4).

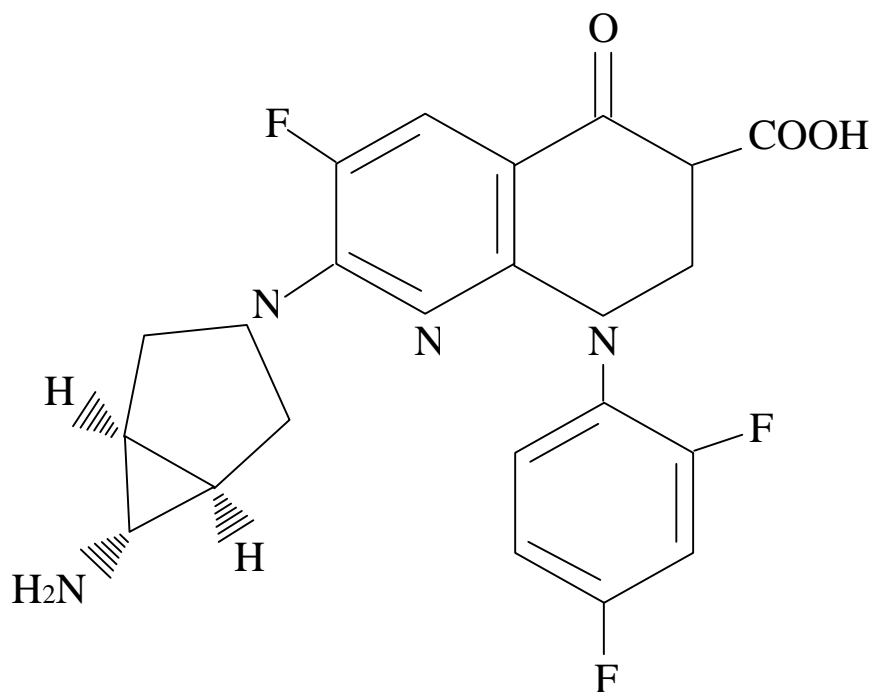


Figura 4. Estructura química de trovafloxacin.

4.2.5.2. Actividad antibacteriana

Mantiene la buena actividad *in vitro* de las quinolonas de segunda generación sobre *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos aerobios, pero es más activa frente a cocos grampositivos aerobios, incluyendo *S. pneumoniae* resistente a penicilina y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (140). También resulta más activa que ciprofloxacino sobre las bacterias anaerobias (141, 142).

4.2.5.3. Farmacocinética

Se ha demostrado que la velocidad de absorción de trovafloxacino es rápida, alcanzándose las concentraciones máximas, aproximadamente 1 hora después de la administración oral del fármaco (143). Se distribuye bien a tejidos y su eliminación se lleva a cabo a través de mecanismos extrarrenales (vía biliar y heces). Una vida media de 10 horas permite la utilización clínica con intervalos de dosificación de 24 horas (144).

4.3. MACRÓLIDOS

Son compuestos de origen natural o semisintético y naturaleza básica, poco hidrosolubles pero liposolubles, con actividad principalmente bactericida (145, 146). Presentan un anillo macrocíclico de 12 a 23 átomos de carbono, al que tienen acoplado uno o varios desoxiazúcares o aminoazúcares. Se clasifican en función del número de elementos contenidos en dicho anillo (147), así tenemos anillos con 14 átomos de carbono, donde encontramos incluida claritromicina. Anillos de 15 átomos de carbono, cuyo representante más destacado es azitromicina. Y anillos de 16 átomos de carbono, donde se incluyen josamicina o midecamicina.

4.3.1. Mecanismo de acción.

Su efecto antibacteriano se debe a la inhibición de la síntesis proteica. Para ello se unen reversiblemente a las proteínas ribosomales L22 y L27 de la subunidad 50S. La ocupación de este lugar por el macrólido impide la translocación, por la que la cadena de aminoácidos en formación, unida al ARN, pasa desde el sitio aceptor (sitio A) al donador (sitio P) e impide la progresión del siguiente codon del ARN (148).

4.3.2. Mecanismo de resistencia.

Son cinco los mecanismos más habituales por los que se expresa resistencia a los macrólidos (149):

1. Disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana.
2. Modificación del sitio de unión ribosomal.
3. Alteración en el ARN ribosomal.
4. Inactivación enzimática.
5. Secreción activa del fármaco al exterior de la bacteria. Hecho que facilita la salida de los macrólidos con anillos de 14 y 15 átomos (150).

La aparición de resistencias, habitualmente es cruzada entre todos los miembros del grupo, y frecuentemente con lincosamidas y cloranfenicol.

4.3.3. Indicaciones

Los macrólidos se utilizan para el tratamiento de las infecciones de las vías respiratorias, altas y bajas, sinusitis, faringitis, infecciones dérmicas y algunas infecciones del tracto genitourinario cuando otros antibióticos de primera elección están contraindicados. Son fármacos de primera elección en infecciones causadas por microorganismos intracelulares como *Chlamydia pneumoniae* o *Mycoplasma pneumoniae*.

4.3.4. CLARITROMICINA

4.3.4.1. Estructura química

Claritromicina (figura 5) es un macrólido semisintético de 14 átomos de carbono derivado de eritromicina.

La metilación en posición 6 le confiere resistencia en medio ácido y una mejor biodisponibilidad por vía oral (151, 152). Se distribuye fácilmente a tejidos gracias a su liposolubilidad, y alcanza altas concentraciones en los diferentes compartimentos tisulares, hasta 10 veces más altas que las hemáticas (153).

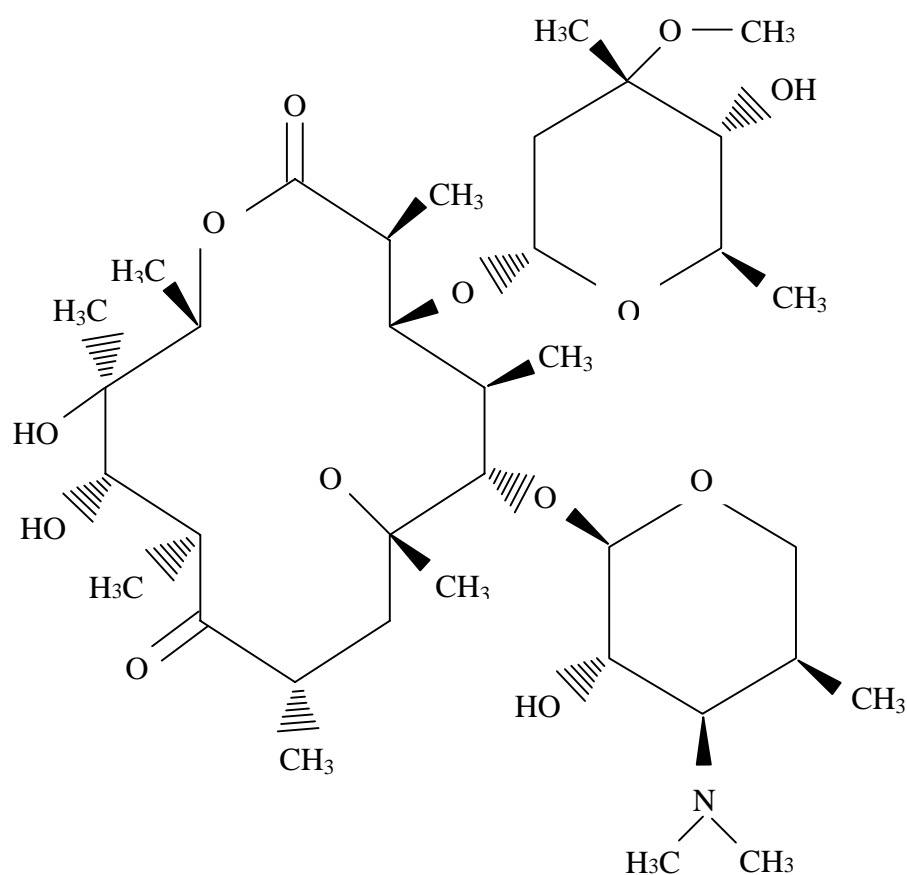


Figura 5. Estructura química de claritromicina.

4.3.4.2. Actividad antibacteriana.

Claritromicina muestra un espectro de acción parecido al de eritromicina pero con mayor potencia (154). Cubriendo eficazmente la mayoría de los estreptococos, y *S. aureus* sensible a meticilina. Es el macrólido más activo frente a la mayor parte de las bacterias anaerobias (155). Su espectro incluye *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Chlamydia. trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Listeria monocytogenes* y otros muchos patógenos (156).

4.3.4.3. Farmacocinética

Claritromicina se absorbe bien por vía oral, alcanzando concentraciones séricas máximas dependientes de la dosis en un plazo de aproximadamente 2 horas. Se metaboliza en el hígado por la acción del sistema microsomal hepático. La semivida de eliminación oscila alrededor de 2 a 3 horas. Se excreta, mayoritariamente a través de la bilis y las heces, y en menor proporción por la orina (157).

4.4. RIFAMICINAS

Son antibióticos semisintéticos de la familia de las ansamicinas, de estructura naftoquinónica, con actividad bactericida y de amplio espectro, que actúan sobre los microorganismos sensibles inhibiendo la síntesis de ADN.

De las cinco familias naturales (A, B, C, D y E) aisladas de cultivos de *Streptomyces mediterranei*, la B resultó ser la más activa y a la que se han incorporado diversos radicales para dar origen a las rifamicinas semisintéticas que se emplean en clínica, como rifampicina.

4.4.1. Mecanismo de acción

Inhiben la síntesis de ARN impidiendo la iniciación de la transcripción, al fijarse a la subunidad beta de la ARN polimerasa bacteriana. Se bloquea así el inicio de la síntesis del ARN, aunque no consigue detener la transcripción del ADN en curso (158).

4.4.2. Actividad antibacteriana.

Las rifamicinas son activas frente a cocos grampositivos como *Staphylococcus*, *S. pneumoniae* y estreptococos alfa y beta hemolíticos. Su espectro también incluye cocos gramnegativos patógenos como *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, y bacilos grampositivos como *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*, etc. Particularmente activas frente a *Mycobacterium tuberculosis* (159).

4.4.3. RIFAMPICINA

4.4.3.1. Estructura química

Por su estructura química las rifamicinas tienen cierta semejanza con los macrólidos. Poseen una molécula compleja integrada por dos partes: una naftoquinona (1,4-dihidronaftaleno) y una larga cadena alifática con cinco grupos metilo que, a modo de puente, une dos extremos del ciclo naftoquinónico. La rifampicina es un derivado de la rifamicina SV con una cadena lateral de piperazina (figura 6).

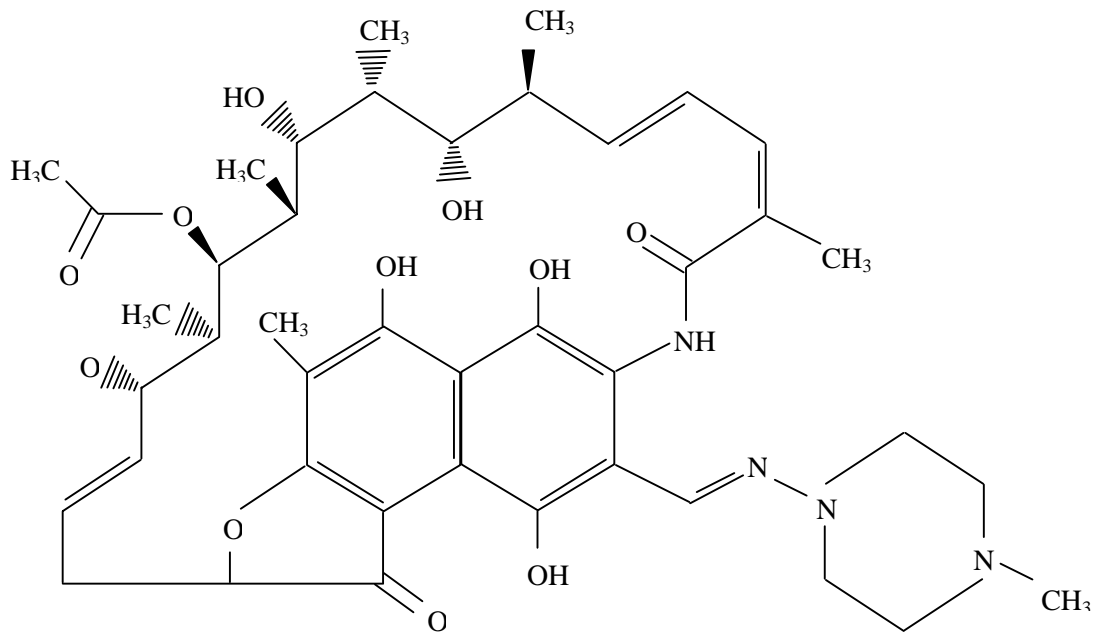


Figura 6. Estructura química de rifampicina.

4.4.3.2. Mecanismo de resistencia

Se atribuye a cambios conformacionales en la estructura de la ARN polimerasa debidos a mutaciones en el gen *rpoB* (codifica para la subunidad beta, sitio de unión de rifampicina), de forma que no se puede establecer el complejo enzima-fármaco y la transcripción puede tener lugar (160, 161). Hasta hoy no se conoce otro tipo de resistencia a este antimicrobiano, pero recientemente se ha sugerido que además de la mutación del gen, la disminución en la permeabilidad podría jugar también un papel importante en la resistencia a rifampicina de bacterias como *N. meningitidis* (162) o *M. tuberculosis* (163).

4.4.3.3. Farmacocinética

La rifampicina, por vía oral, se absorbe de forma rápida y casi completa, con una biodisponibilidad del 90%. Con una dosis oral de 600mg se alcanzan, tras 1-3 horas, concentraciones plasmáticas de 12 a 14 mg/l (164, 165). Difusión tisular y humoral buena, con capacidad de difusión intracelular a macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, etc. Con una vida media de 3 a 5 horas y conjugación con proteínas en un 75-80% (166), su eliminación se lleva a cabo, fundamentalmente por las vías biliar y urinaria.

4.4.3.4. Indicaciones

Se utiliza rifampicina en el tratamiento de la tuberculosis (167), lepra y difteria. Tratamiento de la gonococia, infecciones bacterianas hepatobiliares, infecciones causadas por cocos piógenos resistentes a las penicilinas y otros antibióticos o en enfermos alérgicos a ellos. Además se utiliza como quimioprofilaxis en la enfermedad meningocócica y en la erradicación de los portadores nasofaríngeos de *N. meningitidis*.

OBJETIVOS

1°. Estudio de la actividad antimicrobiana de amoxicilina, ácido clavulánico, amoxicilina/clavulánico, claritromicina, rifampicina, ciprofloxacino y trovafloxacino frente a *N. meningitidis* C-11, medida a través de su CMI, CMB y mediante curvas de letalidad y sub-CMI.

2°. Estudio del efecto postantibiótico de estos antimicrobianos frente a la misma cepa después de su exposición a diferentes concentraciones de los mismos.

3°. Estudio *ex vivo* de la tasa de muerte de *N. meningitidis* C-11 mediada por leucocitos polimorfonucleares, anticuerpos anticapsulares y leucocitos polimorfonucleares y anticuerpos anticapsulares, durante un período de 12 meses, tras la inmunización con la vacuna de polisacáridos AC.

4°. Estudio del nivel de anticuerpos anticapsulares alcanzado por los voluntarios participantes en el estudio a lo largo del mismo.

5°. Estudio de la correlación entre la muerte bacteriana y el nivel de anticuerpos anticapsulares inducido por los voluntarios participantes en el ensayo a lo largo del mismo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. MICROORGANISMO

El microorganismo utilizado en todo el estudio fue *Neisseria meningitidis* serogrupo C-11. Esta cepa es la recomendada para la determinación de los anticuerpos bactericidas ya que es la cepa fuente de los polisacáridos incluidos en la vacuna, y fue suministrada por el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III de Madrid.

Se conservó congelada en viales de leche desnatada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

Para su recuperación se descongelaban alícuotas y se realizaba una siembra de las mismas en placas de agar chocolate polyvitex (bioMérieux). Las placas así inoculadas se incubaban durante 24 horas en estufa (Heraeus) con atmósfera del 5% de CO_2 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del 50%.

1.2. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Müeller-Hinton suplementado con cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} (Difco).
- Agar Müeller-Hinton suplementado con cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} .
- Agar chocolate (bioMérieux).

1.3. SOLUCIONES TAMPON

- Solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), (Difco).

1.4. REACTIVOS, COMPUESTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

- Albúmina

- Suero

1.5. ANTIMICROBIANOS

En el estudio *in vitro* se utilizaron los siguientes antibióticos:

Amoxicilina, ácido clavulánico, amoxicilina/ácido clavulánico en proporción 2:1, suministrados por SmithKline Beecham. Claritromicina, suministrada por Glaxo-Wellcome. Rifampicina, proporcionada por Lepetit. Ciprofloxacino, proporcionado por Bayer y trovafloxacino por Pfizer.

El suministro de los fármacos se realizó en forma de polvo valorado con unas potencias de 861 µg/ml para amoxicilina, 947 µg/ml para ácido clavulánico, 976 µg/ml para claritromicina, 994 µg/ml para rifampicina, 846 µg/ml para ciprofloxacino y 1000 µg/ml para trovafloxacino.

Todos los antimicrobianos se disolvieron en su disolvente correspondiente (168), siguiendo las instrucciones del laboratorio farmacéutico para obtener soluciones madre que se alicuotaron en viales y se conservaron a -18 °C hasta su utilización.

Tanto claritromicina como ácido clavulánico y rifampicina se preparaban en el momento del ensayo.

1.6. LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMNs)

En los experimentos referentes a la valoración de la inmunidad se utilizaron leucocitos polimorfonucleares humanos (PMNs) procedentes de sangre venosa periférica de donantes adultos sanos.

Para el aislamiento de los PMNs se utilizaron:

- Tubos EDTA potásico, para evitar la coagulación de la sangre a partir de la cual se aislaban los PMNs.
- Cloruro amónico (NH₄Cl), para inducir la lisis de los eritrocitos.
- HBSS, medio soporte de los PMNs.

En la comprobación de la viabilidad de los PMNs se utilizó Azul Tripan al 0,4%.

1.7. VOLUNTARIOS

En la valoración de la inmunización participaron un total de 12 voluntarios sanos con falta de actividad antimeningocócica pre-vacunación demostrada (reducción del inóculo inicial < 25% en cualquiera de las curvas de muerte bacteriana realizadas con las muestras basales; títulos de anticuerpos bactericidas < 1:8; títulos de anticuerpos totales determinados por ELISA < 2 µg/ml). La media de edad de los mismos era de 23 años.

1.8. VACUNA

La vacuna empleada en el estudio de valoración de la inmunización fue la de polisacáridos purificados de *Neisseria meningitidis* de los grupos A y C (Mencevax AC).

Cada dosis de vacuna reconstituida contiene 50 µg de cada uno de los polisacáridos de los citados serogrupos. Para su reconstitución contaba con una pastilla de liofilizado (con lactosa como excipiente) más ampolla de disolvente (solución salina). El vial fue almacenado en refrigeración a 2 °C y protegido de la luz solar directa.

Mencevax AC® pertenece al grupo terapéutico J07B3 Otras vacunas asociadas.

Las vacunas fueron suministradas por SmthKline Beecham Biologicals S.A

2. MÉTODO

2.1. VALORACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS

2.1.1. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *N. meningitidis* C-11

La cepa utilizada para todo el estudio se conservó congelada y alicuotada en viales de leche desnatada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Llegado ese momento se descongelaron alícuotas y se realizaron siembras de las mismas en placas de agar chocolate polyvitex (bioMérieux). Las placas así inoculadas se incubaron en estufa (Heraeus) con atmósfera del 5% de CO_2 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del 50% durante 24 horas.

Del meningococo crecido en estas placas se tomaron unas colonias y se llevaron a un matraz que contenía caldo fresco Mueller-Hinton suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} . Este cultivo se incubó en un baño de agitación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Del matraz se tomaron alícuotas cada hora desde el tiempo 0 (considerado como el momento en que se depositan las colonias en el medio fresco) hasta la décima hora, y una última alícuota a las 24 horas. En cada hora se realizó también una medida de la absorbancia a 600 nm (espectrofotómetro Hitachi U-100) para luego poder asociarla con la concentración bacteriana.

En cada tiempo hicimos diluciones seriadas decimales en solución salina (0,9%), obteniéndose una serie de tubos que contenían, cada uno, 10 veces menos concentración de bacterias que el anterior.

El recuento de células viables se hizo en placas de Mueller-Hinton suplementado con cationes. Para ello se sembraron 20 μl de cada tubo de la serie en dichas placas.

Tras 24 horas de incubación en estufa (37 °C; 5% de CO₂, humedad relativa del 50%) se procedió al recuento de las colonias y se obtuvo el número de UFC/ml, la concentración bacteriana a cada tiempo y la absorbancia a 600 nm que correspondía a dicha concentración.

El ensayo de la curva de crecimiento se realizó por triplicado.

2.1.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA (CMI Y CMB).

La CMI de los diferentes antibióticos frente a *N. meningitidis* fue determinada por los métodos de macrodilución y microdilución en caldo, método recomendado por la NCCLS (169).

En la macrodilución se utilizaron una serie de tubos que contenían 1 ml de caldo Müeller-Hinton suplementado con cationes (Ca²⁺ y Mg²⁺) y concentraciones crecientes de antimicrobiano, es decir, cada tubo tenía doble concentración que el siguiente. Se incluyó un control libre de antimicrobiano con 1 ml de caldo. A continuación, se añadió a cada tubo 1 ml de inóculo. Este se preparó ajustando la turbidez de un tubo con solución salina y microorganismos al tubo número 1 de la escala Mc Farland (3 x 10⁸ UFC/ml), y diluyendo después hasta conseguir una concentración de 5 x 10⁵ UFC/ml.

Los tubos se incubaron a 37 °C y en atmósfera con un 5% de CO₂ durante 24 h.

Para la obtención de la CMI y CMB por microdilución se utilizaron placas microtiter. En cada pocillo de la placa se añadían 100 µl de caldo Müeller-Hinton suplementado con cationes y concentraciones crecientes de antimicrobiano, de tal modo que cada pocillo presentaba doble concentración que el siguiente. Se incluyó un control libre de antimicrobiano

con 100 µl de caldo. A continuación, se añadieron a cada tubo, incluido el control, 100 µl de inóculo. Este se preparó de igual forma que en la macrodilución, ajustando la turbidez de un tubo con solución salina y microorganismos al tubo número 1 de la escala Mc Farland (3×10^8 UFC/ml), y diluyendo después hasta conseguir una concentración de 5×10^5 UFC/ml.

Las placas microtiter se incubaron durante 24 h a 37 °C.

Definimos CMI como la mínima concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible (turbidez) de la bacteria respecto a un tubo control libre de fármaco.

Para el cálculo de la concentración mínima bactericida (CMB) se sembraron 10 µl del contenido de cada tubo o cada pocillo, con concentración de antibiótico superior a la CMI obtenida, en placas de agar Müeller-Hinton suplementado con cationes, y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en atmósfera con un 5% de CO₂ y humedad relativa del 50%.

Se tomó como valor de la CMB la menor concentración de antimicrobiano que había eliminado el 99,9% de los microorganismos.

La determinación de la CMI y de la CMB se hizo por triplicado para todos los antimicrobianos ensayados.

2.1.3. DETERMINACIÓN DE LAS CURVAS DE LETALIDAD Y SUB-CMI

Se realizó una siembra en placa de agar chocolate polyvitex (bioMérieux) a partir de una alícuota congelada de *N. meningitidis*.

La placa así inoculada se incubó en estufa (Heraeus) con atmósfera del 5% de CO₂ a 37 °C y humedad relativa del 50% durante 24 horas.

Del meningococo crecido en estas placas se tomaron unas colonias y se llevaron a un matraz que contenía caldo fresco Müeller-Hinton suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} , y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una concentración bacteriana aproximada de 10^6 UFC/ml.

El cultivo así obtenido fue repartido en 5 subcultivos a los que se añadieron concentraciones de antimicrobiano $\frac{1}{4}$ x CMI, $\frac{1}{2}$ x CMI, 1 x CMI, 4 x CMI, y 10 x CMI. Un sexto subcultivo libre de antibiótico se utilizó como control. Todo se incubó durante 24 horas a 37 °C en baño de agitación.

Se tomaron alícuotas del control y de todos los subcultivos sometidos a tratamiento a tiempos 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas, y se realizaron diluciones seriadas decimales en solución salina (0,9 %), obteniéndose una serie de tubos que contenían cada uno 10 veces menos concentración de bacterias que el anterior.

El recuento de células viables se realizó en placas de Müeller-Hinton suplementado con cationes. Para ello se sembraron 20 μ l de cada tubo en dichas placas. Tras 24 horas de incubación (37 °C; 5% de CO_2 ; 50% de humedad) se procedía al recuento de las colonias y se obtenía el número de UFC/ml y la concentración bacteriana a cada tiempo.

Se midió el efecto antibacteriano de cada antimicrobiano calculando los cambios en la viabilidad de las bacterias, es decir, calculando la diferencia entre el \log_{10} UFC/ml de las bacterias tratadas a lo largo del tiempo respecto del \log_{10} UFC/ml de las bacterias al inicio del experimento (T = 0).

La actividad bactericida (máxima muerte bacteriana) se calculó como una reducción del inóculo inicial en las UFC/ml debida al tratamiento antimicrobiano, y se expresó como el porcentaje de reducción del inóculo inicial (RII), que se calculó mediante la expresión:

$$\text{RII} = 100 - (100 \times \text{It/Ii}),$$

Donde

I_t = inóculo en cada tiempo.

I_i = inóculo inicial.

Se considera que se alcanza la actividad bactericida cuando se consigue la eliminación del 99,9 % de los microorganismos o la disminución en 3 ó mas \log_{10} de las UFC/ml.

La determinación de las curvas de letalidad y sub-CMI se realizó por triplicado para cada antimicrobiano ensayado.

2.1.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO POSTANTIBIÓTICO (EPA)

El efecto postantibiótico (EPA) es la supresión del crecimiento bacteriano que persiste tras la exposición de un microorganismo a un fármaco (170). Para comprobar la existencia de EPA se determina la cinética de crecimiento bacteriano una vez eliminado el antimicrobiano del medio de cultivo. En estas condiciones el EPA se define como la diferencia en el tiempo (horas) que se requiere para que el recuento de UFC en un cultivo problema aumente 1 \log_{10} tras eliminar el antimicrobiano, y el tiempo requerido para que el número de UFC en un cultivo control aumente también 1 \log_{10} con respecto al recuento observado inmediatamente antes de completar el mismo procedimiento empleado con el cultivo problema (171).

La cuantificación del EPA se realizó sometiendo a un cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento (10^6 UFC/ml aprox.) a la acción de concentraciones de antimicrobiano 1 x CMI, 4 x CMI y 10 x CMI, comparando después con un control.

Todos los cultivos bacterianos fueron expuestos a la acción de las diferentes concentraciones de los antibióticos durante 1 hora, excepto el cultivo control, que siguió el mismo protocolo pero libre de fármaco.

Finalizado el tiempo de exposición los antimicrobianos fueron eliminados mediante técnicas de dilución (172).

En un matraz con 25 ml de caldo Müeller-Hinton suplementado con cationes se depositaron unas colonias de meningococo. Este cultivo se incubó hasta alcanzar una concentración bacteriana de 10^6 UFC/ml, momento en el que el microorganismo fue expuesto a la acción del antimicrobiano a la concentración correspondiente. Se mantuvo un matraz libre de antibiótico como control.

Todos los matraces se incubaron en baño de agitación durante 1 hora. Tras este tiempo se procedió a eliminar el antibiótico de los matraces mediante dilución 1:1000 (172). Como diluyente se utilizó caldo fresco Müeller-Hinton suplementado con cationes. El mismo protocolo se siguió para el control.

Los cultivos lavados y libres de antimicrobiano se incubaron durante 6 horas en baño de agitación a 37 °C.

Se tomaron alícuotas (20 μ l) de los mismos, realizándose recuentos bacterianos a cada hora, desde el tiempo 0 (momento de la dilución) y hasta la 6ª hora.

Todo este protocolo se realizó por triplicado para todos los antimicrobianos ensayados.

El cálculo de la duración del EPA se efectuó mediante la ecuación (173):

$$\mathbf{EPA = T - C}$$

donde T es el tiempo en horas que tarda el cultivo de microorganismos tratados en incrementar $1 \log_{10}$ su concentración a partir del tiempo 0 (eliminación del antimicrobiano), y C es el tiempo en horas que tarda el cultivo control en incrementar $1 \log_{10}$ su concentración a partir del tiempo 0.

La duración del EPA se tomó como la media de los tres experimentos y se consideró significativo si era superior a 30 minutos (170).

2.2. VALORACIÓN DE LA INMUNIZACIÓN

Se administró una dosis de la vacuna de polisacáridos AC frente a *N. meningitidis* serogrupo C, con objeto de valorar la tasa de muerte *ex vivo* de *N. meningitidis* y determinar si la respuesta protectora antimeningocócica, desarrollada en 12 voluntarios sanos seleccionados, estaba mediada por anticuerpos o por fagocitosis.

2.2.1. SELECCIÓN DE VOLUNTARIOS

El periodo de reclutamiento de los sujetos participantes en el estudio fue de 3 meses, en los cuales se entrevistó a 42 candidatos. A todos ellos se les realizó una analítica completa y se les hizo un estudio serológico, donde se comprobaron anticuerpos totales y bactericidas.

Los individuos que además de presentar un título de anticuerpos bactericidas $< 1:8$ y una concentración de anticuerpos totales $< 2\mu\text{g/ml}$, mostraban falta de actividad antimeningocócica (reducción del inóculo inicial $< 25\%$) en las curvas de muerte basales se eligieron como sujetos de estudio.

2.2.2. RECONSTITUCIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LA VACUNA.

Para la reconstitución de la vacuna de polisacáridos AC se añadió todo el contenido de una ampolla de diluyente (solución salina) a un vial de vacuna liofilizada. La pastilla de liofilizado se disolvió por completo en el diluyente, dando una solución clara y transparente.

Una vez reconstituida se administró inmediatamente al voluntario por vía subcutánea profunda.

Los voluntarios permanecían en observación durante 30 minutos después de la administración de la vacuna.

2.2.3. TRATAMIENTO

Se realizaron 4 visitas a lo largo de los 12 meses que duró el estudio: una antes de la inmunización (visita basal), y las otras tres a las 6 semanas (6 S), 6 meses (6 M) y 12 meses (12 M) de la vacunación, respectivamente.

En todas las visitas se siguió el mismo protocolo, que incluía:

2.2.3.1. Toma de muestra sanguínea.

En cada visita se extraía de cada voluntario una muestra sanguínea de 20 ml, de la que obtendríamos suero y PMNs por procedimientos diferentes.

2.2.3.2. Obtención y tratamiento de suero humano.

El suero humano normal era obtenido a partir de sangre venosa sin heparinizar de los voluntarios del estudio.

Parte de este suero se sometía a inactivación por calor para desestabilizar las proteínas del sistema de complemento, aplicando durante 30 minutos, temperaturas de 56 °C. Este constituía el suero inactivado (Si). El resto se mantenía refrigerado hasta su utilización en el ensayo. Esta última porción era la considerada como suero activo(S), donde el sistema de complemento estaría intacto y funcional.

2.2.3.3. Aislamiento de leucocitos polimorfo nucleares (PMNs)

Los PMNs de sangre periférica extraída de cada voluntario sano y anticoagulada en tubos de EDTA potásico, se aislaron por el método de centrifugación diferencial descrito por Paul Egleton (174).

A 5 ml de sangre anticoagulada en tubos EDTA se le añadían 16 ml de cloruro amónico frío (pH 7,4). Se mezclaba bien y se mantenía en hielo durante 15 minutos para permitir la hemólisis de los eritrocitos. Esta suspensión celular se centrifugaba a 160 x g durante 10 minutos en contenedores universales de poliestireno de fondo cónico (25 mm x 90 mm). Una vez centrifugado, las células rojas hemolizadas (sobrenadante) eran descartadas, resuspendiéndose el sedimento de leucocitos en cloruro amónico. A continuación se realizaba una nueva centrifugación en las mismas condiciones. Se eliminaba el sobrenadante y se resuspendía el precipitado en 5ml de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (Gibco BRL). Las células se centrifugaban nuevamente a 55 x g durante 10 minutos. El sedimento de PMN resultante tras la eliminación del sobrenadante se resuspendía en 1 ml de HBSS y se mantenía a 4 °C hasta su utilización en las curvas de muerte bacterianas con PMN.

2.2.3.4. Recuento y ajuste de leucocitos polimorfonucleares (PMN)

La determinación del número de PMNs se realizó en cámara de Neubauer. Se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

1. Número de leucocitos contados: es la media del número de PMN en los cuatro cuadrantes de la parte superior de la cámara y de los cuatro cuadrantes de la parte inferior.
2. Corrección de volumen: considerando que cada cuadrante de la cámara tiene unas dimensiones de 1 x 1 x 0,1, y por tanto un volumen de 0,1 mm³. Como los leucocitos han sido contados en los cuatro cuadrantes, el volumen total considerado será de 0,4 mm³. Para obtener un volumen de 1 mm³ debe multiplicarse 0,4 por 2,5, que es el factor de corrección de volumen.
3. Corrección de dilución: debido a que las células habían sido diluidas al 1:10, el factor de corrección de la dilución será igual a 10.
4. Recuento final: $\text{PMN/mm}^3 = \text{n}^\circ \text{ de leucocitos contados} \times \text{corrección de volumen} \times \text{corrección de dilución}$.

Para obtener el número de PMN por ml, el resultado de la operación anterior se multiplica por 1000.

Para nuestro ensayo necesitábamos una concentración determinada de PMN que mantuviera una relación con las bacterias de 1:1, así que, inmediatamente antes del experimento, los PMN se ajustaban a una concentración de 10⁷ PMN/ml siguiendo la fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ PMN obtenido}/100 = X;$$

$$X \times \text{Volumen de HBSS añadido (1ml)} = Y;$$

$$Y - \text{Vol añadido (1ml)} = Z$$

Donde Z = volumen de HBSS que hay que añadir para ajustar a 10^7 PMN/ml.

2.2.3.5. Estudio de la viabilidad de celular

La viabilidad de los PMN se determinó por exclusión del colorante vital azul de tripan al inicio y al final del experimento. El recuento de células blancas se realizó en cámara de Neubauer. Estas preparaciones debían contener más de 95% de células blancas viables al principio de cada experimento.

2.2.3.6. Determinación de las curvas de muerte

Para la realización de las curvas de muerte era necesario descongelar una alícuota y realizar siembras en placas de agar chocolate polyvitex. Las placas así inoculadas se incubaban durante 24 horas en estufa con atmósfera del 5% de CO_2 a 37 °C con humedad relativa del 50%.

Del meningococo crecido en estas placas, como previamente se ha explicado, se tomaban unas colonias y se llevaban a un matraz que contenía caldo fresco Mueller-Hinton suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} . Este cultivo se hacía crecer en un baño de agitación a 37 °C hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,2, lo que equivalía a una concentración bacteriana de, aproximadamente, 10^7 UFC/ml. Esta concentración era la requerida para el comienzo del experimento.

Una vez realizados los pasos anteriores teníamos todos los componentes necesarios para el desarrollo del ensayo. El inóculo se añadía entonces a tubos estériles que contenían las siguientes mezclas:

1. HBSS (con 0,1% de albúmina) + microorganismo, (C).
2. HBSS (con 0,1% de albúmina) + microorganismo+ PMN, (P)
3. HBSS (con 0,1% de albúmina) + microorganismo + suero, (S)
4. HBSS (con 0,1% de albúmina) + microorganismo + suero inactivado, (Si)
5. HBSS (con 0,1% de albúmina) + microorganismo + suero + PMN, (SP).
6. HBSS (con 0,1% de albúmina) + microorganismo+ suero inactivado+ PMN, (SiP).

El volumen final de cada tubo era de 2 ml y se ajustaba con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) a la que se añadía un 0,1% de albúmina.

El porcentaje de suero utilizado, tanto normal como inactivo (sometido a 56 °C durante 30 minutos), fue del 20% y la relación final entre bacterias y PMN fue de 1:1, con concentraciones de 10^6 UFC/ml y 10^6 PMN/ml, respectivamente.

De tal modo que cada tubo, rotulado como sigue, contenía las proporciones que se indican de cada componente:

	Microorganismo	HBSS	Suero activo	Suero inactivo	PMN
C	200 µl	1800 µl	-	-	-
P	200 µl	1600 µl	-	-	200 µl
S	200 µl	1400 µl	400 µl	-	-
Si	200 µl	1400 µl	-	400 µl	-
SP	200 µl	1200 µl	400 µl	-	200 µl
SiP	200 µl	1200 µl	-	400 µl	200 µl

Los tubos del ensayo se incubaban a 37 °C en baño de agitación durante los 120 minutos que duraba el mismo.

Se tomaban alícuotas a tiempos 0, 30, 60 y 120 minutos, y se realizaban diluciones seriadas decimales en tubos. Estos contenían solución salina (0,9%), excepto el primero de la batería, que contenía agua básica estéril (pH= 10,8), para romper los leucocitos y liberar las bacterias intracelulares (175). De este modo se obtenía una serie de tubos que contenía cada uno 10 veces menos concentración de bacterias que el anterior.

El recuento de células viables se hacía en placas de Müeller-Hinton suplementado con cationes. Para ello se sembraban 20 µl de cada uno de los tubos de la batería en dichas placas. Tras 24 horas de incubación a 37 °C en estufa con atmósfera del 5% de CO₂ y humedad relativa del 50%, se procedía al cómputo de las colonias y se obtenía el número de UFC/ml, y la concentración bacteriana a cada tiempo.

2.2.3.7. Determinación de anticuerpos bactericidas

La determinación del título de anticuerpos bactericidas se llevó a cabo en el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III de Madrid, tanto en la visita basal como en las visitas post-vacunación (6S, 6M y 12M).

Los anticuerpos bactericidas se determinaron siguiendo el protocolo del “Center for Disease Control” americano (CDC) (176).

Se utilizó la cepa recomendada C-11 y diluciones dobles del suero desde el 1:2 a 1:512.

El título de anticuerpos bactericidas se define como aquella dilución capaz de eliminar el 50% ó más del crecimiento bacteriano a tiempo 0.

2.2.3.8. Determinación de los anticuerpos totales

La determinación de los anticuerpos totales se hizo siguiendo el protocolo del CDC (177) en el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III de Madrid.

Esta determinación se llevó a cabo mediante ELISA, tanto en la visita basal como en las visitas post-vacunación (6S, 6M, 12M).

Las muestras de suero fueron analizadas en una serie de 8 diluciones dobles (dilución inicial 1:150) del suero estándar utilizado como control.

La técnica es un clásico enzimoimmunoensayo que utiliza polisacárido C del meningococo grupo C11 como antígeno soporte para que se unan los posibles anticuerpos del suero, que a su vez son posteriormente detectados por monoclonales anti-IgG, IgM e IgA humanos, conjugados con peroxidasa y revelados mediante la utilización de un sustrato adecuado (tetrametilbenzidina).

2.2.3.9. Determinación de isotipos IgG1, IgG2 e IgA.

La determinación de la presencia de anticuerpos (isotipos IgG1, IgG2 e IgA) antipolisacárido de *N. meningitidis* en el suero de los individuos inmunizados con la vacuna de polisacáridos AC, se realizó en el Centro de Técnicas Inmunológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, posteriormente a la administración de la vacuna.

Las muestras de suero fueron analizadas mediante técnicas de ELISA.

2.2.4. SEGUIMIENTO

Se realizó una primera visita de seguimiento a las 6 semanas de la administración de la vacuna, y visitas posteriores con una periodicidad de 6 meses hasta completar el año de seguimiento, objeto de este estudio.

El intervalo máximo de tiempo permitido entre visitas fue de ± 4 días para la visita a las 6 semanas y de ± 15 días para las demás visitas programadas.

En cada una de las visitas se tomaba una muestra sanguínea de 20 ml para la realización de las curvas de muerte bacteriana y la determinación de anticuerpos anticapsulares.

Para la realización de las curvas de muerte bacteriana en la visita basal (pre-vacunación) y en las visitas post-vacunación (6 semana, 6 mes y 12 mes) se siguió el mismo protocolo previamente expuesto.

Para la determinación de los anticuerpos bactericidas y totales durante las visitas de seguimiento también se utilizó el mismo método que para las determinaciones basales.

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos aportados en el estudio de valoración de antimicrobianos se expresaron como media de los resultados obtenidos en todos los experimentos.

En el estudio de valoración de la inmunidad, el test estadístico utilizado en la comparación de las curvas de muerte en cada visita fue el análisis de la varianza para 1 factor (ANOVA). Consideramos valores de $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativos.

En la comparación de los diferentes tratamientos a lo largo de las visitas utilizamos el test de Scheffe, considerando valores de $p \leq 0,05$ estadísticamente significativos.

Para la comparación de los valores de anticuerpos totales obtenidos a lo largo de las visitas realizamos el test de la t de student para muestras relacionadas, considerando valores de $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativos

Realizamos el test de correlación de Pearson para comprobar la relación existente entre la reducción de las UFC/ml y el nivel de anticuerpos totales inducidos frente a *N. meningitidis*.

Para comprobar la existencia de correlación entre el nivel de anticuerpos totales de cada voluntario y el porcentaje de IgA presente en el suero de los mismos, se utilizó el test paramétrico de correlación de Pearson y el no paramétrico de Spearman.

RESULTADOS

1. VALORACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS.

1.1. CURVA DE CRECIMIENTO DE *N. meningitidis* C11.

En la figura 1 se recoge la representación de la curva de crecimiento de *N. meningitidis* C11.

1.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA (CMI y CMB).

En la tabla 1 se muestran las CMIs y CMBs de los antimicrobianos estudiados frente a *N. meningitidis* C-11.

No se obtuvieron diferencias entre las CMIs y CMBs obtenidas por los dos métodos ensayados: macrodilución y microdilución.

Se obtuvo el mismo valor de CMI para amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico, coincidiendo el valor de la CMB con el de la CMI. Con ello parece, en principio, que el ácido clavulánico no tendría actividad antibacteriana frente a la cepa en estudio, y no influiría en la actividad de amoxicilina.

Frente al ácido clavulánico el microorganismo presenta una menor sensibilidad (CMI = CMB = 1mg/l), lo que parece corroborar la baja actividad de este compuesto frente a la cepa en estudio.

El nivel de sensibilidad a rifampicina es muy alto, teniendo en cuenta las concentraciones críticas de sensibilidad y resistencia definidas por el grupo MENSURA (178).

La cepa seleccionada resulta también muy sensible a las dos quinolonas ensayadas, ciprofloxacino y trovafloxacino, para las cuales se obtienen los valores más bajos de CMI y

CMB (0.0037 mg/l). Lo mismo ocurre con el macrólido, para quien la sensibilidad obtenida también es aceptable.

En todos los antimicrobianos, los valores de las CMBs coinciden con los de las CMIs, excepto en el caso de claritromicina, donde la CMB resulta dos diluciones mayor que la CMI (tabla 1).

1.3. CURVAS DE LETALIDAD Y SUB-CMI.

Las curvas de crecimiento-letalidad de *N. meningitidis* frente a los antimicrobianos en estudio están representadas en las figuras 2-8. Los cambios en la viabilidad debida a la acción de estos antimicrobianos se observan en las tablas 2-8.

1.3.1. CURVA DE LETALIDAD DE *N. meningitidis* FRENTE A AMOXICILINA.

La figura 2, refleja la curva de letalidad de *N. meningitidis* tratada con $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina. En ella se aprecian diferencias entre las bacterias tratadas con todas las concentraciones y las control, datos que se reflejan en la tabla 2, donde se aprecian los cambios en la viabilidad bacteriana de ambas. Por otro lado, la mínima concentración de amoxicilina capaz de disminuir en $3 \log_{10}$ las UFC/ml fue 1 CMI. También se observa que, a medida que aumenta la concentración de antimicrobiano disminuye el tiempo en alcanzar esa reducción, de tal manera que con 10 CMI se alcanzó la actividad bactericida en la mitad de tiempo (4 horas) que con 1 CMI (8 horas) (tabla 2).

1.3.2. CURVA DE LETALIDAD DE *N. meningitidis* FRENTE A AMOXICILINA/CLAVULÁNICO.

La figura 3, refleja la curva de letalidad de *N. meningitidis* tratada con $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 4 y 10 CMI de la combinación amoxicilina/clavulánico. En ella observamos que también existen diferencias entre las bacterias tratadas con cualquier concentración (sub y supra-CMI) y las control, es decir, se aprecian diferencias entre los cambios en la viabilidad bacteriana de ambos tipos de bacterias (tabla 3). A concentraciones sub-CMI ($\frac{1}{2}$ CMI) amoxicilina/clavulánico es capaz de inducir efecto bactericida a partir de la cuarta hora, reduciéndose este tiempo al aumentar la concentración de antimicrobiano, de tal manera que con 10 CMI se alcanza la actividad bactericida a las 2 horas (tabla 3). Además, amoxicilina/clavulánico presentó la mayor velocidad de actividad bactericida de todos los antimicrobianos ensayados y para todas las concentraciones (Tabla 9), ya que en sólo 4 horas y a concentraciones sub-CMI es capaz de reducir en $3 \log_{10}$ las UFC/ml.

1.3.3. CURVA DE LETALIDAD DE *N. meningitidis* FRENTE A ÁCIDO CLAVULÁNICO.

La figura 4, muestra la curva de letalidad de *N. meningitidis* tratada con $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 4 y 10 CMI de ácido clavulánico. En ella observamos que también existen diferencias entre las bacterias tratadas con cualquier concentración (sub y supra-CMI) y las control, es decir, se aprecian diferencias entre los cambios en la viabilidad bacteriana de ambos tipos de bacterias (tabla 4), aunque estas diferencias no son tan marcadas a concentraciones sub-CMI como a supra-CMI. A concentraciones iguales o menores a la CMI ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y 1 CMI) el ácido clavulánico no es capaz de inducir efecto bactericida sobre el meningococo, pero a

concentraciones supra-CMI (4 y 10 CMI) logra alcanzar la actividad bactericida a las 6 y 4 horas, respectivamente.

1.3.4. CURVA DE LETALIDAD DE *N. meningitidis* FRENTE A CLARITROMICINA.

La figura 5, muestra la curva de letalidad de *N. meningitidis* tratada con $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 4 y 10 CMI de claritromicina. En ella observamos que no existen diferencias entre las bacterias tratadas a concentraciones sub-CMI ($\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ CMI) y las control, es decir, no se aprecian diferencias entre los cambios en la viabilidad bacteriana de ambos tipos de bacterias (tabla 5). Si existen diferencias entre las bacterias control y las tratadas a concentraciones iguales o superiores a la CMI (1, 4 y 10 CMI). Así, a las 24 horas claritromicina es capaz de inducir efecto bactericida sobre el meningococo a estas concentraciones (Tabla 9). Se observa también que un aumento en la concentración de antimicrobiano no implica una disminución en el tiempo en alcanzar la actividad bactericida, de tal modo que independientemente de la concentración claritromicina alcanza el efecto bactericida a las 24 horas.

1.3.5. CURVA DE LETALIDAD DE *N. meningitidis* FRENTE A RIFAMPICINA.

La figura 6, muestra la curva de letalidad de *N. meningitidis* tratada con $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 4 y 10 CMI de rifampicina. En ella observamos que no existen diferencias entre las bacterias tratadas a concentraciones iguales e inferiores a la CMI ($\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ y 1 CMI) y las control, es decir, no se aprecian diferencias entre los cambios en la viabilidad bacteriana de ambos tipos de bacterias (tabla 6). Si existen diferencias entre las bacterias control y las tratadas a concentraciones supra-CMI (4 y 10 CMI), pero solo a concentración de 10 CMI rifampicina

es capaz de reducir en $3 \log_{10}$ las UFC/ml, habiendo alcanzado la actividad bactericida a las 6 horas (Tabla 9).

1.3.6. CURVA DE LETALIDAD DE *N. meningitidis* FRENTE A CIPROFLOXACINO.

La figura 7, muestra la curva de letalidad de *N. meningitidis* tratada con $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 4 y 10 CMI de ciprofloxacino. En ella observamos que no existen diferencias entre las bacterias tratadas a concentraciones sub-CMI ($\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ CMI) y las control, es decir, no se aprecian diferencias entre los cambios en la viabilidad bacteriana de ambos tipos de bacterias (tabla 7). Si existen diferencias entre las bacterias control y las sometidas a concentraciones iguales o superiores a la CMI (1, 4 y 10 CMI), de forma que el tratamiento con 1 CMI induce efecto bactericida a las 24 horas, reduciéndose este tiempo al aumentar la concentración de antimicrobiano, de tal manera que con 4 CMI el efecto bactericida ya se ha inducido a las 6 horas y con 10 CMI este tiempo se reduce a 2 horas (tabla 9).

1.3.7. CURVA DE LETALIDAD DE *N. meningitidis* FRENTE A TROVAFLOXACINO.

La figura 8, muestra la curva de letalidad de *N. meningitidis* tratada con $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 4 y 10 CMI de trovafloxacino. En ella observamos que no existen diferencias entre las bacterias tratadas a concentraciones sub-CMI ($\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ CMI) y las control, es decir, no se aprecian diferencias entre los cambios en la viabilidad bacteriana de ambos tipos de bacterias (tabla 8). Entre las bacterias control y las sometidas a concentraciones iguales o superiores a la CMI (1, 4 y 10 CMI) si existen diferencias. Así, el tratamiento con 1 CMI induce efecto bactericida a

las 24 horas, reduciéndose este tiempo al aumentar la concentración de antimicrobiano, de tal manera que con 4 CMI la actividad bactericida ya se ha alcanzado a las 6 horas y con 10 CMI este tiempo se reduce a 2 horas (tabla 9).

1.4. EFECTO BACTERICIDA.

En las figuras 9 y 10, se representan (como valor absoluto de la media) los cambios en la viabilidad bacteriana inducidos por cada concentración de antimicrobiano para nuestra cepa a la 4ª y 8ª horas, señalándose con una recta el punto a partir del cual se alcanza el efecto bactericida.

En la tabla 9, se observa el tiempo en horas que tarda en alcanzarse (si se logra) el efecto bactericida. Amoxicilina/clavulánico es el antimicrobiano que presenta la mayor velocidad de actividad bactericida de todos y para todas las concentraciones, ya que en sólo 4 horas y a concentraciones sub-CMI es capaz de reducir en más de 3 log₁₀ las UFC/ml.

En la tabla 10 se recoge el porcentaje de reducción del inóculo inicial que se consigue con los distintos antimicrobianos utilizados a la 8ª hora de ensayo.

1.5. EFECTO POSTANTIBIÓTICO.

El efecto inducido *in vitro* sobre el crecimiento de *N. meningitidis* C-11 tras una exposición de 1 hora a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI de los antimicrobianos ensayados se muestra en las figuras 11-17.

En la tabla 11 aparecen los valores de EPA inducidos por cada antimicrobiano. Se considera un EPA significativo el superior a 30 minutos (170).

Amoxicilina y ácido clavulánico, tanto por separado como en asociación, no produjeron EPA significativo sobre nuestra cepa, incluso fue negativo en el caso del ácido clavulánico, recuperándose una vez eliminado el antimicrobiano del medio, más rápido las bacterias sometidas a tratamiento que las control. Además, incrementos en la concentración no implicaron un aumento del EPA (tabla 11).

Claritromicina a concentración igual a la CMI indujo EPA negativo. Sin embargo cuando la concentración se elevaba, se obtuvo EPA positivo aunque todavía muy corto (tabla 11).

Rifampicina también mostró EPA negativo al ensayar concentraciones de 1 y 4 CMI, pero se obtuvo un valor significativo al someter a la cepa a concentraciones de 10 CMI (tabla 11).

Las quinolonas fueron los antimicrobianos que indujeron EPAs más largos (mayores de 2 horas) frente a la cepa del estudio, observándose que la duración del EPA no se mostraba indiferente a incrementos de la concentración, y aumentaba con estos.

2. VALORACIÓN DE LA INMUNIZACIÓN.

La tasa de muerte de *N. meningitidis* C-11 fue ensayada durante un período de tiempo de un año, en las 4 visitas de seguimiento realizadas a los voluntarios participantes en el ensayo: una antes de la inmunización (visita basal) y las otras tres a las 6 semanas, 6 meses y 12 meses tras la vacunación.

2.1. CURVAS DE MUERTE DE *N. meningitidis* C11 EN CADA VISITA.

Las curvas de muerte de *N. meningitidis* en presencia de suero (S), suero inactivado (Si) y PMNs (P) están representadas en las figuras 18-21. Los cambios en la viabilidad bacteriana debida a estas exposiciones se observan en la tabla 12. El porcentaje de reducción del inóculo inicial (%RII) en cada visita a los 120 minutos del ensayo está recogido en la tabla 13 y en la figura 22.

2.1.1. VISITA BASAL.

La figura 18, refleja la curva de muerte *N. meningitidis* en presencia de suero normal (S) e inactivado (Si) y Suero normal e inactivado + PMNs (SP, SiP), extraídos de los voluntarios en la visita basal (antes de la vacunación). En ella no se observan diferencias significativas entre las bacterias sometidas a la acción del suero y los PMNs y las control (C, P), ya que el microorganismo crece en presencia de cualquiera de los tratamientos recibidos (S, Si, SP, SiP). Este crecimiento resulta más acentuado cuando ocurre en presencia de suero. Todos estos datos quedan recogidos en la tabla 12, donde se aprecian los cambios en la viabilidad bacteriana entre las bacterias sometidas a dichos tratamientos.

2.1.2. VISITA 6 SEMANAS.

La figura 19, refleja la curva de muerte *N. meningitidis* en presencia de suero (normal e inactivado) y PMNs extraídos de los voluntarios en la visita realizada 6 semanas después de la inmunización con la vacuna de polisacáridos AC. El análisis estadístico de estos datos (análisis de la varianza) confirmó que no existían diferencias significativas entre las bacterias sometidas a la acción del suero inactivado (Si) y del suero inactivado + PMNs (SiP) y las

control (C, P), ya que el microorganismo creció en presencia de estos tratamientos, incluso por encima de las curvas control (figura 19). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las bacterias sometidas a la acción del suero inactivado (Si) respecto de las del suero inactivado + PMNs (SiP). Si aparecieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los cambios en la viabilidad bacteriana de las bacterias crecidas en presencia de suero (S) y suero + PMNs (SP) y todas las demás (C, P, Si, SiP) (tabla 12), observándose una reducción del inóculo inicial de más del 25% en esas curvas (tabla 13). Por otro lado no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las bacterias crecidas en presencia de suero (S) y las que lo hicieron en presencia de suero + PMNs (SP), obteniéndose reducciones del inóculo inicial muy similares para ambas, 95,49% y 88,39%, respectivamente (tabla 13) (figura 22).

2.1.3. VISITA 6 MES.

La figura 20, refleja la curva de muerte *N. meningitidis* en presencia de suero y PMNs extraídos de los voluntarios en la visita realizada 6 meses después de la vacunación. Se confirmó, mediante el análisis estadístico de los datos (análisis de la varianza), que existían diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los cambios en la viabilidad bacteriana de las bacterias crecidas en presencia de suero (S) y suero + PMNs (SP) y todas las demás (C, P, Si, SiP) (tabla 12), observándose una reducción del inóculo inicial de más del 25% en esas curvas (tabla 13). No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre las bacterias crecidas en presencia de suero (S) y las que lo hicieron en presencia de suero + PMNs (SP), obteniéndose reducciones del inóculo inicial muy similares para ambas, 79,95% y 85,78%, respectivamente (tabla 13) (figura 22).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre las bacterias control (C, P) y las sometidas a la acción del suero inactivado + PMNs (SiP). Pero estas diferencias fueron ligeramente significativas ($p = 0,041$; $p = 0,024$) respecto de las bacterias sometidas a suero inactivado (Si), experimentando estas últimas un mayor crecimiento que las curvas control (C, P). No obstante no existieron diferencias entre el crecimiento de las bacterias sometidas al tratamiento de suero inactivado (Si) y las que crecieron en presencia de suero inactivado + PMNs (SiP) (tabla 12).

2.1.4. VISITA 12 MES.

En la figura 21 quedan recogidas las curvas de muerte de *N. meningitidis* en presencia de suero y PMNs extraídos de los voluntarios en la visita de seguimiento realizada a los 12 meses de la vacunación.

El análisis de estos datos (análisis de la varianza) confirmó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las bacterias sometidas a la acción del suero inactivado (Si) y del suero inactivado + PMNs (SiP) y las control (C, P), ya que el microorganismo creció de igual forma en presencia de estos tratamientos. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las bacterias sometidas a la acción del suero inactivado (Si) respecto de las del suero inactivado + PMNs (SiP). Si aparecieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los cambios en la viabilidad bacteriana de las bacterias crecidas en presencia de suero (S) y suero + PMNs (SP) y todas las demás (C, P, Si, SiP) (tabla 12), observándose una reducción del inóculo inicial de más del 25% en esas curvas (tabla 13). Por otro lado no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las bacterias crecidas en presencia de suero (S) y las que lo hicieron en presencia de suero + PMNs (SP), obteniéndose unas reducciones

del inóculo inicial similares para ambas, del 82,56% y 95,39%, respectivamente (tabla 13) (figura 22).

2.2. CURVAS DE MUERTE DE *N. meningitidis* A LO LARGO DE LAS VISITAS.

Si lo que comparamos son los distintos tratamientos (C, P, S, Si, SP, SiP) a lo largo de las visitas de seguimiento obtenemos lo que se muestra en las tablas 14a - 14f.

Para las curvas utilizadas como controles (C y P) no se observaron diferencias significativas (test de Scheffe) en la reducción del Log_{10} de las UFC/ml entre las visitas basales y las postvacunación (tablas 14a y 14b). De igual modo tampoco se apreciaron estas diferencias entre las visitas acontecidas una vez vacunados los sujetos y hasta el final del estudio.

2.2.1. CURVA CON SUERO (S).

Si nos detenemos en el tratamiento realizado con suero normal (S) encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) (test de Scheffe) en la reducción del Log_{10} de las UFC/ml entre la visita basal y el resto de las visitas (6 semana, 6 mes, 12 mes). Si comparamos lo que ocurre entre las visitas realizadas después de la vacunación (6 semana, 6 mes, 12 mes), comprobamos que no existen diferencias significativas (tabla 14c).

2.2.2. CURVA CON SUERO INACTIVADO (Si).

Si tenemos en cuenta lo que se refleja en la tabla 14d con el tratamiento de suero inactivado (Si), observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas en la

disminución del Log_{10} UFC/ml entre la visita basal y las visitas posteriores. Tampoco se aprecian diferencias significativas entre ninguna de las visitas realizadas tras la vacunación.

2.2.3. CURVA CON SUERO + PMNs (SP).

En el caso del tratamiento con suero normal + PMNs (SP) (tabla 14e), se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la reducción del Log_{10} de las UFC/ml entre la visita basal y las visitas postvacunación (6 semanas, 6 mes y 12 mes). No se encontraron diferencias significativas entre las visitas realizadas después de la inmunización.

2.2.4. CURVA CON SUERO INACTIVADO + PMNs (SiP).

En la tabla 14f observamos lo que ocurre con el tratamiento de suero inactivado + PMNs (SiP). No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en la reducción del Log_{10} UFC/ml entre la visita basal y las visitas realizadas a las 6 semanas, 6 meses y 12 meses de la vacunación. De igual modo tampoco se obtuvieron diferencias entre las distintas visitas realizas postvacunación.

2.3. ANTICUERPOS TOTALES Y BACTERICIDAS.

La determinación de los anticuerpos totales y bactericidas inducidos por los voluntarios participantes en el ensayo tras la vacunación, se siguió también a lo largo de un año, y de igual modo en 4 visitas repartidas en una previa a la vacunación (basal) y tres post-inmunización (6 semanas, 6 meses y 12 meses).

En la figura 23 se recoge la media de anticuerpos totales inducidos a lo largo de las visitas por los voluntarios participantes en el ensayo.

Tras la vacunación se obtuvo un incremento considerable de los anticuerpos totales, alcanzándose el máximo nivel de anticuerpos a las 6 semanas de la administración de la vacuna, con valores de 67,78 $\mu\text{g/ml}$ (figura 23). A partir de este momento el nivel de anticuerpos totales fue disminuyendo ligeramente hasta llegar a concentraciones de 60,18 $\mu\text{g/ml}$ a los 12 meses de la vacunación, valor que está muy por encima del nivel prevacunación (1,01 $\mu\text{g/ml}$).

El análisis estadístico de estos datos (t de student), confirmó la existencia de diferencias significativas entre los anticuerpos totales inducidos en la visita basal y los anticuerpos totales inducidos en todas las visitas post-vacunación (6 semana, 6 mes, 12 mes). Pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los cambios en la concentración de anticuerpos entre las visitas post-vacunación, de forma que en todas ellas, incluida la de los 12 meses, el nivel de anticuerpos totales se mantuvo significativamente más alto que el nivel basal (pre-vacunación).

Todos los voluntarios participantes mantuvieron en todas las visitas unos niveles de anticuerpos totales post-vacunación determinados por ELISA $> 2 \mu\text{g/ml}$.

En la figura 24 se recoge la mediana del título de anticuerpos bactericidas inducido por los voluntarios en cada visita.

Se partió de un título de anticuerpos bactericidas basales inferior a 8. Tras la vacunación también se obtuvo un incremento importante de los anticuerpos bactericidas, alcanzándose el título máximo de anticuerpos después de las primeras 6 semanas de la vacunación, con un valor de 4096 (figura 24). A partir de este momento el título de

anticuerpos bactericidas disminuyó hasta llegar a 256 a los 6 meses de la inmunización, valor que se mantuvo hasta el final del periodo ensayado.

En la tabla 15 se recoge la correlación entre el nivel de anticuerpos y la disminución de las UFC/ml inducida por los tratamientos con suero (S) y suero + PMNs (SP). La correlación obtenida entre la concentración de anticuerpos totales y la actividad bactericida (expresada como reducción en el Log_{10} UFC/ml) mostrada por las curvas de letalidad en presencia de suero normal (las únicas capaces de eliminar el microorganismo) no resultó estadísticamente significativa, obteniéndose unos coeficientes de correlación de Pearson de 0,051 para el tratamiento con suero (S) y 0,179 para el tratamiento con suero + PMNs (SP).

2.4. CASOS CON RII < 25%.

Como ha quedado reflejado con anterioridad, los voluntarios participantes en el ensayo experimentaron una respuesta tras la inmunización, que se tradujo en el aumento del nivel de anticuerpos y en la disminución de las UFC/ml.

La reducción post-vacunación en las UFC/ml no se observó en 2 de los 12 voluntarios participantes (voluntarios nº 6 y nº 11), cuyas curvas de muerte aparecen en las figuras 25 y 26. En ellas se aprecia que ninguno de los tratamientos es capaz de eliminar al microorganismo en ninguna de las visitas realizadas tras la administración de la vacuna, obteniéndose un crecimiento similar al experimentado por las curvas control en todas ellas.

En la figura 27, observamos el nivel de anticuerpos totales y bactericidas inducidos por estos voluntarios tras la vacunación. El suero de estos 2 sujetos presentó una concentración de anticuerpos totales significativamente más elevada que la inicial, que se

mantuvo hasta el final del estudio (12 meses). El título de anticuerpos bactericidas también resultó significativamente mayor que el encontrado antes de la vacunación, pero fue disminuyendo gradualmente hasta el final del periodo ensayado.

En la figura 28 se muestra el porcentaje de individuos cuyas curvas de muerte son capaces de inducir la eliminación de la bacteria (83%) frente a los sujetos incapaces de hacerlo (17%).

2.5. ISOTIPOS IgG1, IgG2 E IgA.

La determinación por ELISA de la presencia de anticuerpos IgG1 e IgG2 en el suero de los individuos inmunizados no fue posible, ya que no se detectaron dichos isotipos. Si se detectaron anticuerpos anti-polisacárido del isotipo IgA. El resultado se expresa como porcentaje (%) de concentración de anticuerpos de isotipo IgA anti-polisacárido, respecto al individuo con máxima concentración detectada (voluntario n° 8), y queda reflejado en la tabla 16.

El estudio individualizado del nivel de anticuerpos totales y bactericidas, y el porcentaje de IgA determinados por ELISA se recogen en la tabla 16, donde podemos apreciar que los voluntarios 6 y 11 presentan uno de los niveles más bajos de anticuerpos totales a lo largo del tiempo. En ellos se observa también una marcada disminución en el título de anticuerpos bactericidas, pero esta no se diferencia significativamente de la experimentada por el resto de los voluntarios.

Asimismo comprobamos la existencia de una correlación significativamente distinta de 0 entre la concentración de anticuerpos totales y el porcentaje de IgA, obteniéndose un

coeficiente de correlación de Pearson de 0,708. De igual modo, las correlaciones no paramétricas (test de Spearman) también resultaron significativas con un coeficiente de correlación de 0,860.

TABLAS Y FIGURAS

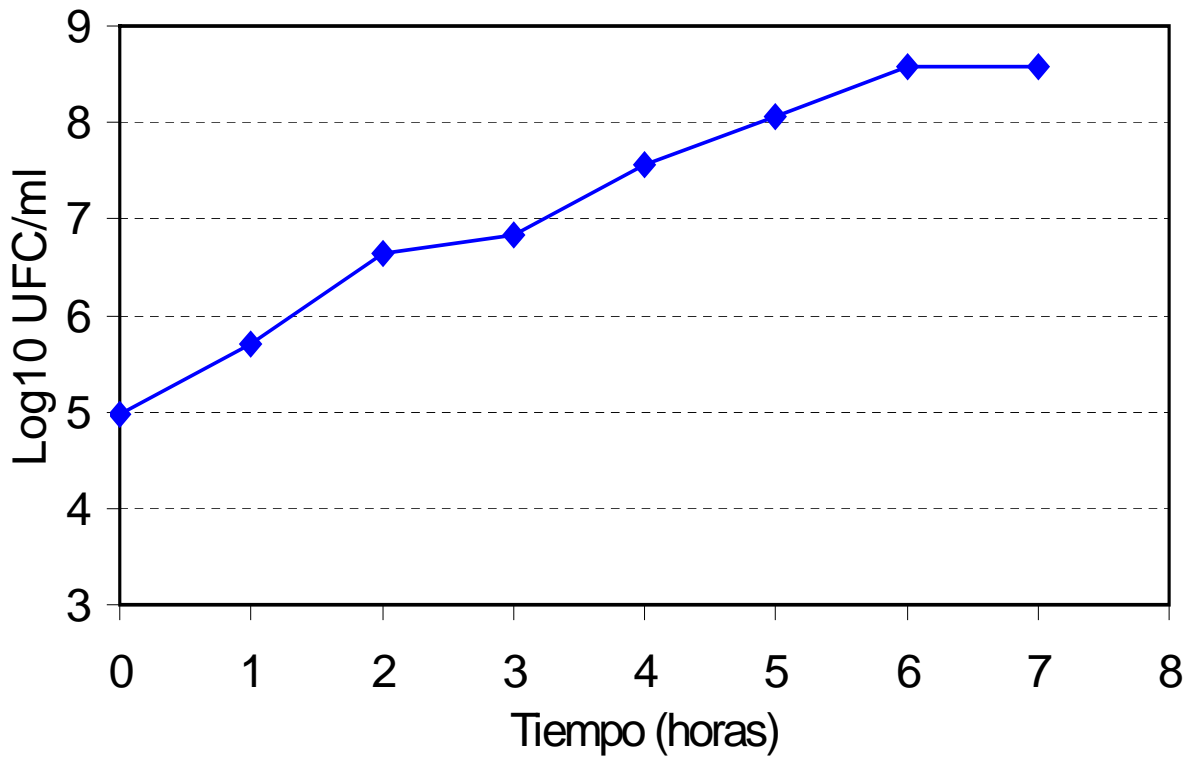


Figura 1. Representación de la curva de crecimiento de *N. meningitidis* C11.

ANTIMICROBIANO	MICRODILUCIÓN		MACRODILUCIÓN	
	CMI (mg/l)	CMB (mg/l)	CMI (mg/l)	CMB (mg/l)
Amoxicilina	0.06	0.06	0,06	0,06
Amox/Clav	0.06	0.06	0.03	0,03
Ac. Clavulánico	1	1	1	1
Claritromicina	0.06	0.25	0.12	0,25
Rifampicina	0.0075	0.0075	0.0075	0,0075
Ciprofloxacino	0.0037	0.0037	0.0037	0,0037
Trovafloxacino	0.0037	0.0037	0.0037	0,0037

Tabla 1. CMI y CMB de amoxicilina, ácido clavulánico, amoxicilina/ácido clavulánico (2:1), claritromicina, rifampicina, ciprofloxacino y trovafloxacino frente a *N. meningitidis* C-11.

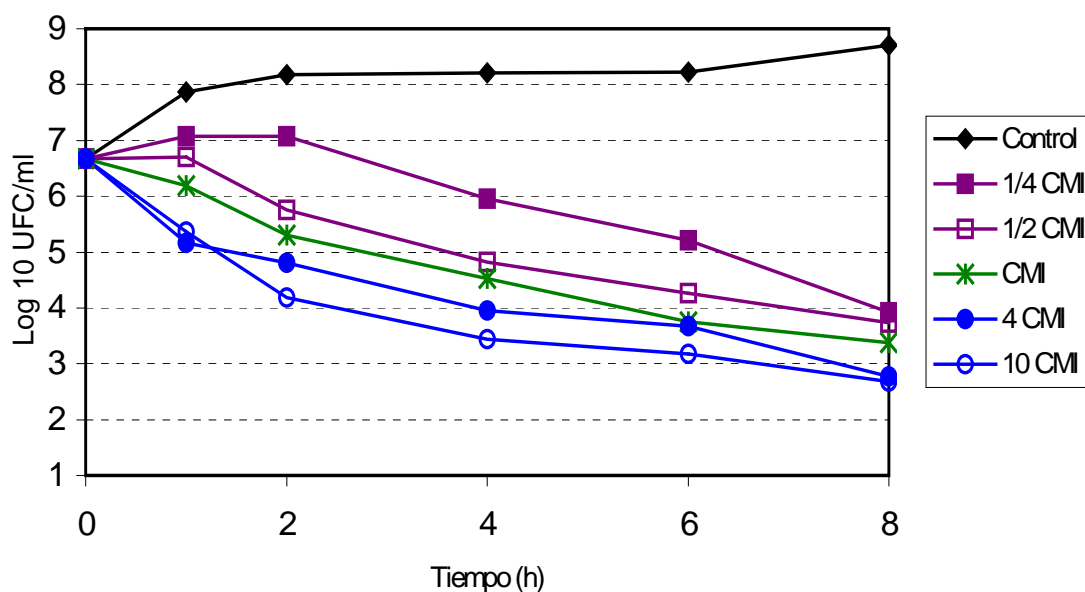


Figura 2. Curvas de letalidad de *N. meningitidis* C-11 en presencia de ¼, ½, 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina.

Tiempo (h)	Control	1/4 CMI	1/2 CMI	CMI	4 CMI	10 CMI
T ₁	-1,19	-0,40	-0,03	0,49	1,52	1,31
T ₂	-1,50	-0,39	0,92	1,36	1,86	2,49
T ₄	-1,54	0,72	1,86	2,15	2,72	3,23
T ₆	-1,54	1,47	2,41	2,93	3,00	3,50
T ₈	-2,04	2,75	2,95	3,30	3,90	4,00

Tabla 2. Reducción del inóculo inicial (RII) (en Log) en presencia de amoxicilina.

Consideramos que existe actividad bactericida si RII > 3Log.

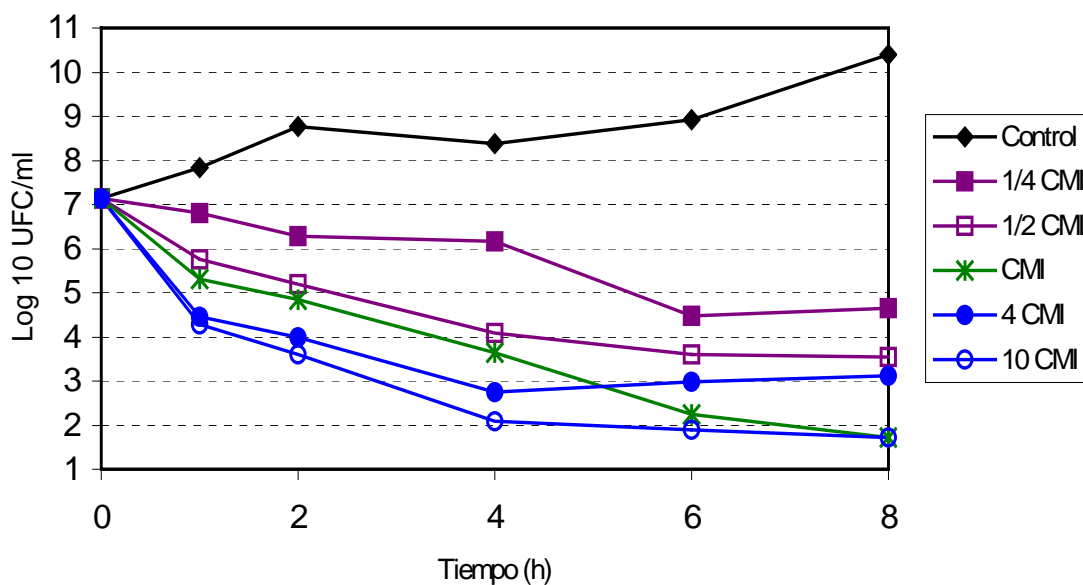


Figura 3. Curvas de letalidad de *N. meningitidis* C-11 en presencia de ¼, ½, 1, 4 y 10 CMI de amoxicilina/clavulánico (2:1).

Tiempo (h)	Control	1/4 CMI	1/2 CMI	CMI	4 CMI	10 CMI
T ₁	-0,71	0,34	1,38	1,83	2,67	2,86
T ₂	-1,64	0,86	1,94	2,29	3,15	3,53
T ₄	-1,25	0,97	3,05	3,50	4,39	5,04
T ₆	-1,79	2,66	3,53	4,89	4,15	5,25
T ₈	-3,26	2,48	3,58	5,41	4,02	5,41

Tabla 3. Reducción del inóculo inicial (RII) (en Log) en presencia de amoxicilina/clavulánico (2:1). Consideramos que existe actividad bactericida si RII>3Log.

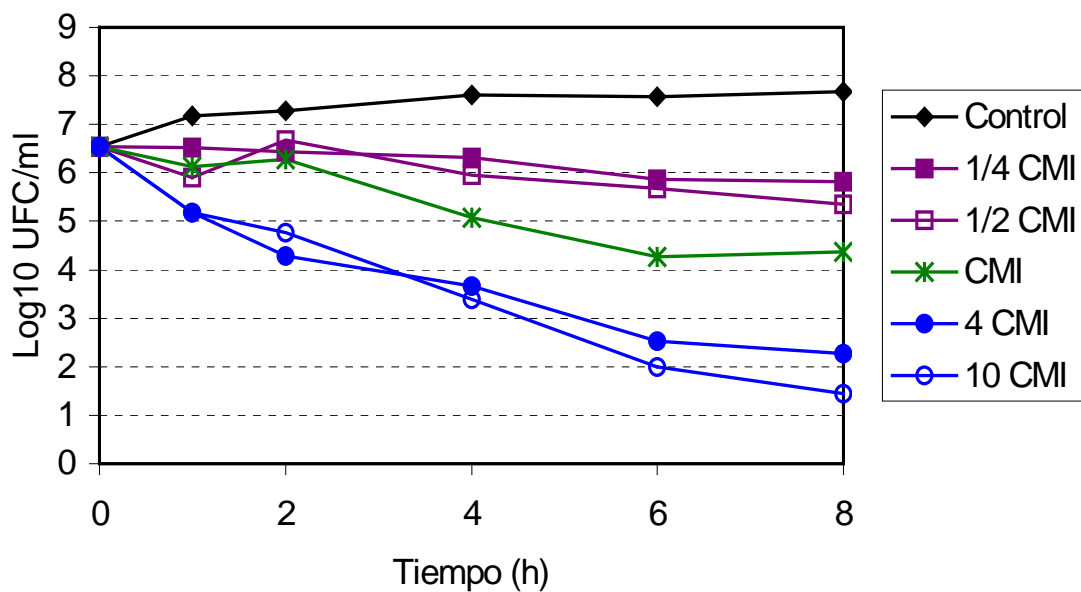


Figura 4. Curvas de letalidad de *N. meningitidis* C-11 en presencia de ¼, ½, 1, 4 y 10 CMI de ácido clavulánico.

Tiempo	Control	1/4 CMI	1/2	CMI	4 CMI	10 CMI
T ₁	-0,63	0,02	0,65	0,41	1,37	1,36
T ₂	-0,75	0,11	-0,13	0,26	2,25	1,77
T ₄	-1,06	0,23	0,59	1,46	2,88	3,16
T ₆	-1,03	0,68	0,86	2,27	4,01	4,54
T ₈	-1,12	0,72	1,18	2,18	4,26	5,10

Tabla 4. Reducción del inóculo inicial (RII) (en Log) en presencia ácido clavulánico. Consideramos que existe actividad bactericida si RII > 3Log.

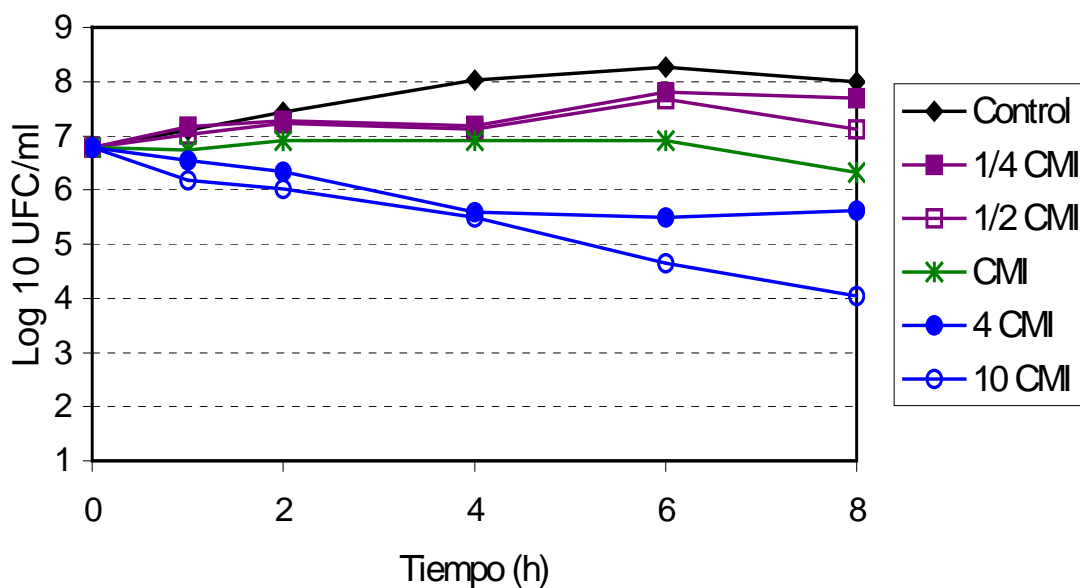


Figura 5. Curvas de letalidad de *N. meningitidis* C-11 en presencia de ¼, ½, 1, 4 y 10 CMI de claritromicina.

Tiempo	Control	1/4 CMI	1/2 CMI	CMI	4 CMI	10 CMI
T ₁	-0,33	-0,39	-0,24	0,05	0,24	0,61
T ₂	-0,66	-0,49	-0,45	-0,12	0,45	0,77
T ₄	-1,24	-0,39	-0,33	-0,13	1,20	1,29
T ₆	-1,48	-1,01	-0,89	-0,14	1,29	2,13
T ₈	-1,22	-0,90	-0,33	0,47	1,17	2,74

Tabla 5. Reducción del inóculo inicial (RII) (en Log) en presencia claritromicina. Consideramos que existe actividad bactericida si RII>3Log.

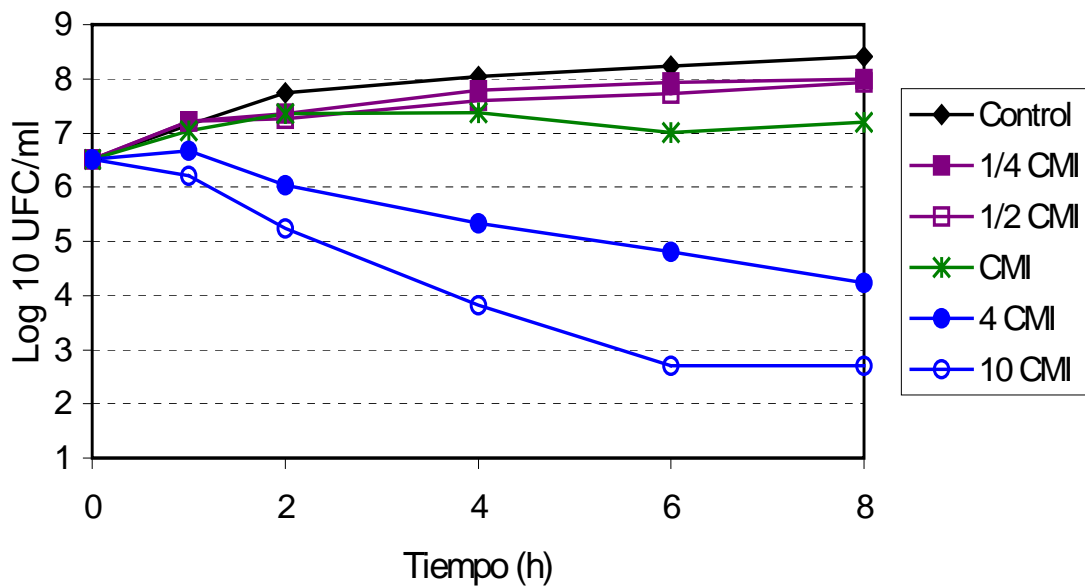


Figura 6. Curvas de letalidad de *N. meningitidis* en presencia de 1/4, 1/2, 1, 4 y 10 CMI de rifampicina.

Tiempo	Control	1/4CMI	1/2CMI	CMI	4 CMI	10 CMI
T ₁	-0,64	-0,69	-0,69	-0,53	-0,16	0,30
T ₂	-1,22	-0,84	-0,75	-0,84	0,48	1,28
T ₄	-1,52	-1,27	-1,08	-0,86	1,18	2,70
T ₆	-1,72	-1,41	-1,20	-0,49	1,72	3,82
T ₈	-1,89	-1,48	-1,41	-0,68	2,28	3,82

Tabla 6. Reducción del inóculo inicial (RII) (en Log) en presencia rifampicina. Consideramos que existe actividad bactericida si RII>3Log.

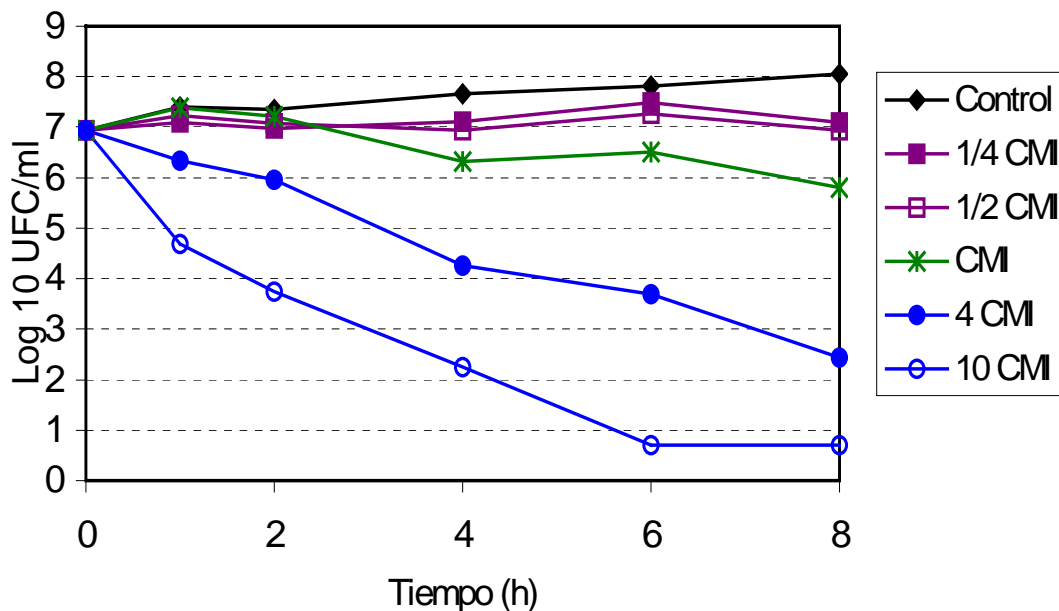


Figura 7. Curvas de letalidad de *N. meningitidis* C-11 en presencia de ¼, ½, 1, 4 y 10 CMI de ciprofloxacino.

Tiempo	Control	1/4CMI	1/2CMI	CMI	4 CMI	10 CMI
T ₁	-0,47	-0,16	-0,30	-0,45	0,59	2,26
T ₂	-0,42	-0,03	-0,14	-0,27	0,97	3,20
T ₄	-0,72	-0,18	-0,00	0,61	2,68	4,69
T ₆	-0,89	-0,55	-0,34	0,43	3,24	6,24
T ₈	-1,12	-0,15	-0,01	1,14	4,49	6,24

Tabla 7. Reducción del inóculo inicial (RII) (en Log) en presencia ciprofloxacino. Consideramos que existe actividad bactericida si RII > 3Log.

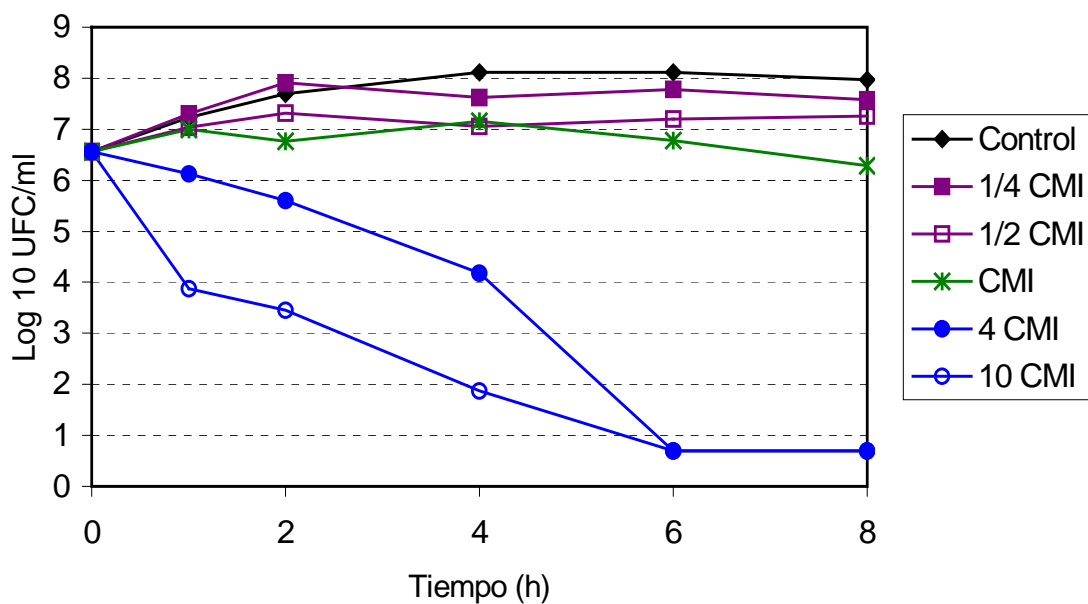


Figura 8. Curvas de letalidad de *N. meningitidis* C-11 en presencia de ¼, ½, 1, 4 y 10 CMI de trovafloxacino.

Tiempo	Control	1/4CMI	1/2CMI	CMI	4 CMI	10 CMI
T ₁	-0,67	-0,74	-0,48	-0,44	0,44	2,69
T ₂	-1,12	-1,35	-0,76	-0,20	0,95	3,11
T ₄	-1,55	-1,05	-0,50	-0,60	2,38	4,69
T ₆	-1,55	-1,21	-0,63	-0,22	5,86	5,86
T ₈	-1,41	-1,02	-0,70	0,28	5,86	5,86

Tabla 8. Reducción del inóculo inicial (RII) (en Log) en presencia trovafloxacino. Consideramos que existe actividad bactericida si RII>3Log.

Log10 UFC (T4-T0)

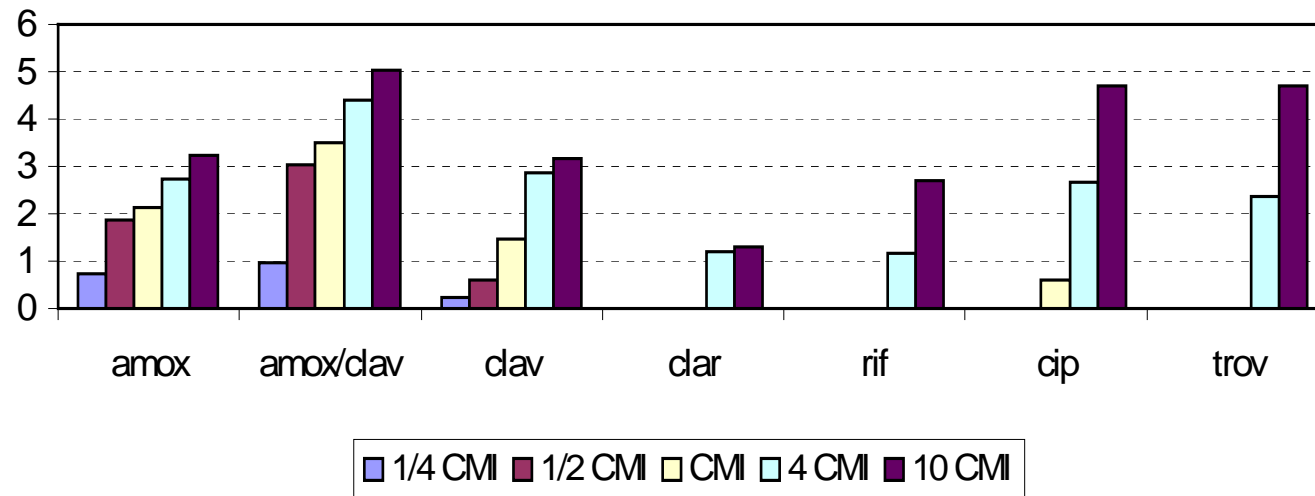


Figura 9. Diferencia de logaritmos a la 4ª hora de exposición de las bacterias a 1/4, 1/2, 1, 4 y 10 CMI de los distintos antimicrobianos.

Log10 UFC (T8-T0)

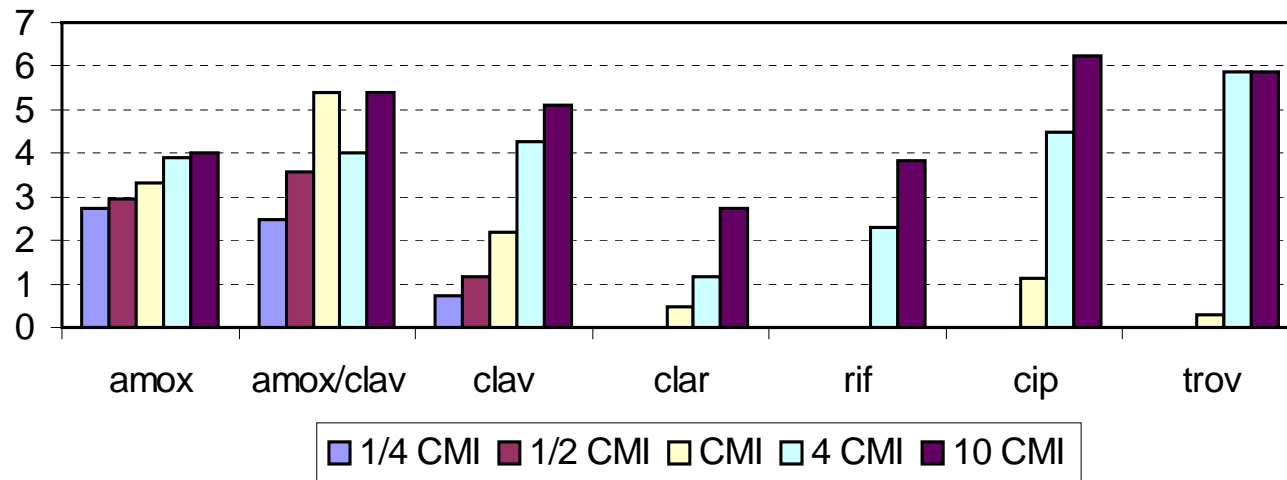


Figura 10. Diferencia de logaritmos a la 8ª hora de exposición de las bacterias a 1/4, 1/2, 1, 4 y 10 CMI de los distintos antimicrobianos.

ANTIMICROBIANO	¼ x CMI	½ x CMI	1 x CMI	4 x CMI	10 x CMI
Amoxicilina	- ^a	24	8	6	4
Amoxicilina/ Clavulánico	- ^a	4	4	2	2
Clavulánico	- ^a	- ^a	- ^a	6	4
Claritromicina	- ^a	- ^a	24	24	24
Rifampicina	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	6
Ciprofloxacino	- ^a	- ^a	24	6	2
Trovafloxacino	- ^a	- ^a	24	6	2

Tabla 9. Tiempo (en horas) que se tarda en alcanzar la actividad bactericida (disminución de 3 log₁₀ UFC/ml).

^a No se llega a alcanzar actividad bactericida en el tiempo del ensayo (24 horas).

	Control	¼ x CMI	½ x CMI	1x CMI	4 x CMI	10 x CMI
Amoxicilina	-10.811	99,82	99,88	99,95	99,98	99,98
Amoxicilina/ clavulánico	-8.782	99.67	99,97	99,99	99,99	99,99
Clavulánico	-3.053	-269	-10,76	76,46	99,98	99,99
Claritromicina	-1.561	-700	-115	65,95	93,20	99,81
Rifampicina	-7.620	-2.912	-2.486	-380	99,48	99,98
Ciprofloxacino	-75,44	81,28	70,53	91,13	99,99	99,99
Trovafloxacino	-2.489	-930	-401	47,39	99,99	99,99

Tabla 10. Porcentaje de reducción del inóculo inicial (%RII) a la 8^a h del ensayo.

ANTIMICROBIANO	1 x CMI	4 x CMI	10 x CMI
Amoxicilina	0,2	0,4	0,4
Amoxicilina/ Clavulánico	0,2	0,4	0,1
Clavulánico	-1,5	-1,1	-0,3
Claritromicina	0	0,2	0,6
Rifampicina	0	0	0,8
Ciprofloxacino	0,1	1,8	2,3
Trovafloxacino	0,1	1,5	2,3

Tabla 11. Efecto postantibiótico (en horas) de los diferentes antimicrobianos frente a *N. meningitidis* C-11.

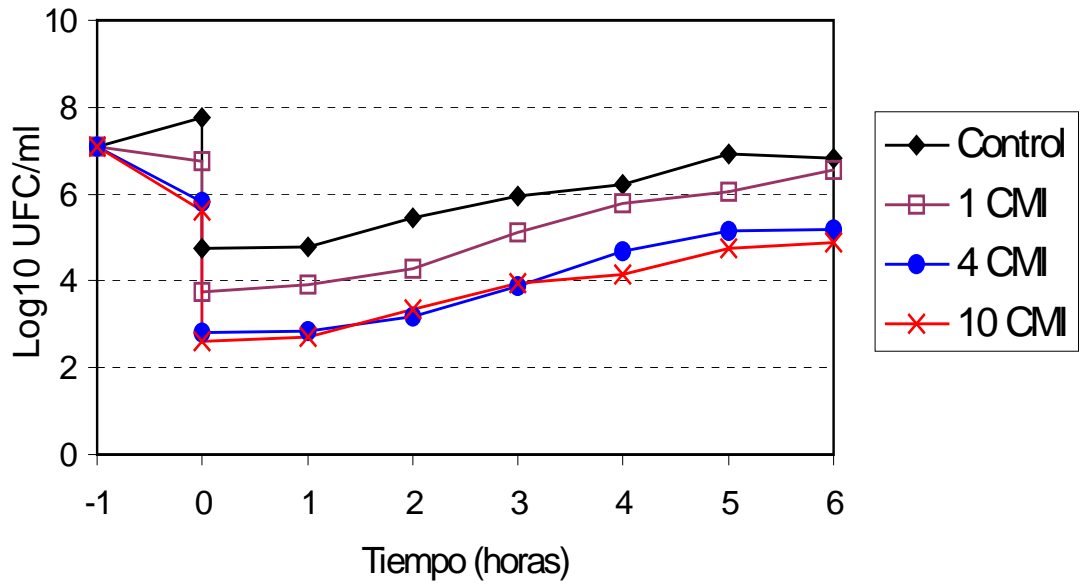


Figura 11. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de amoxicilina a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI.

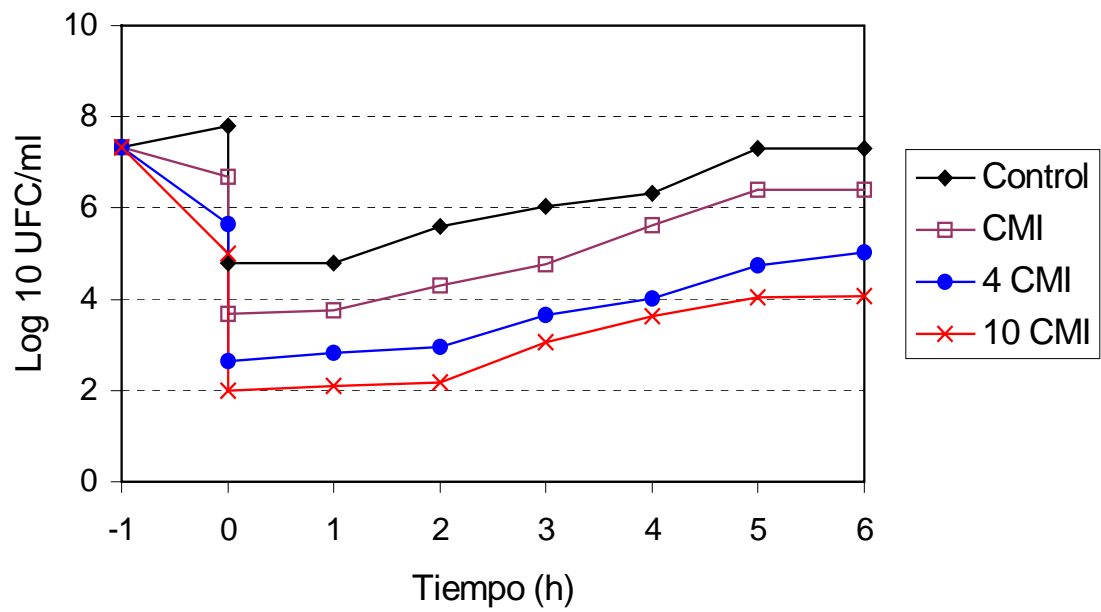


Figura 12. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de amoxicilina/clavulánico a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI.

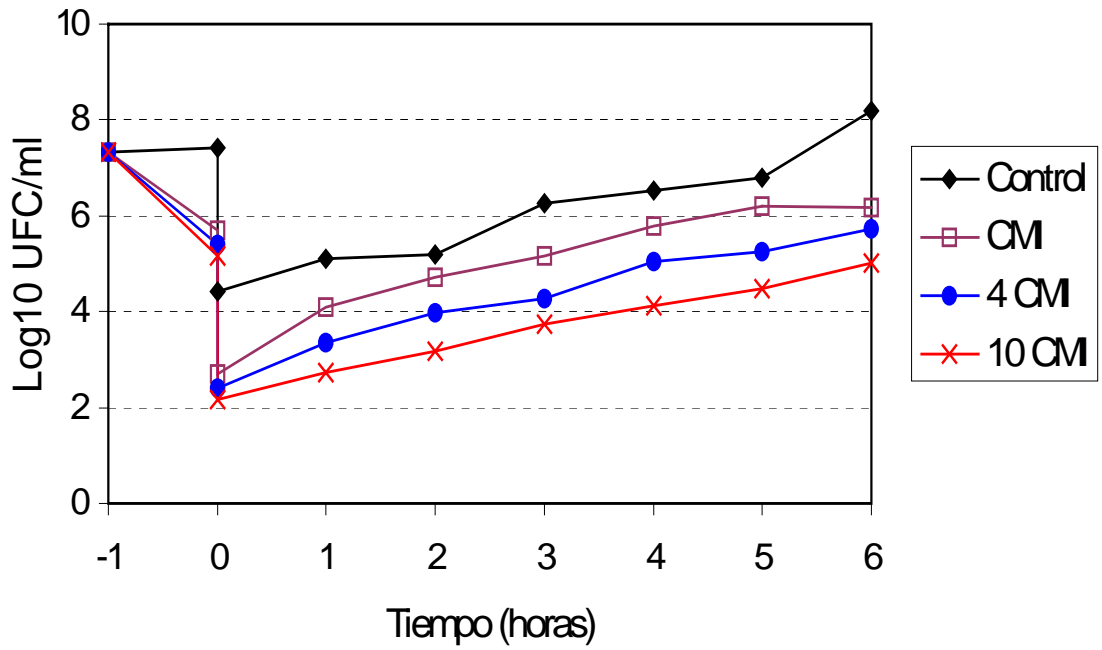


Figura 13. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de ácido clavulánico a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI.

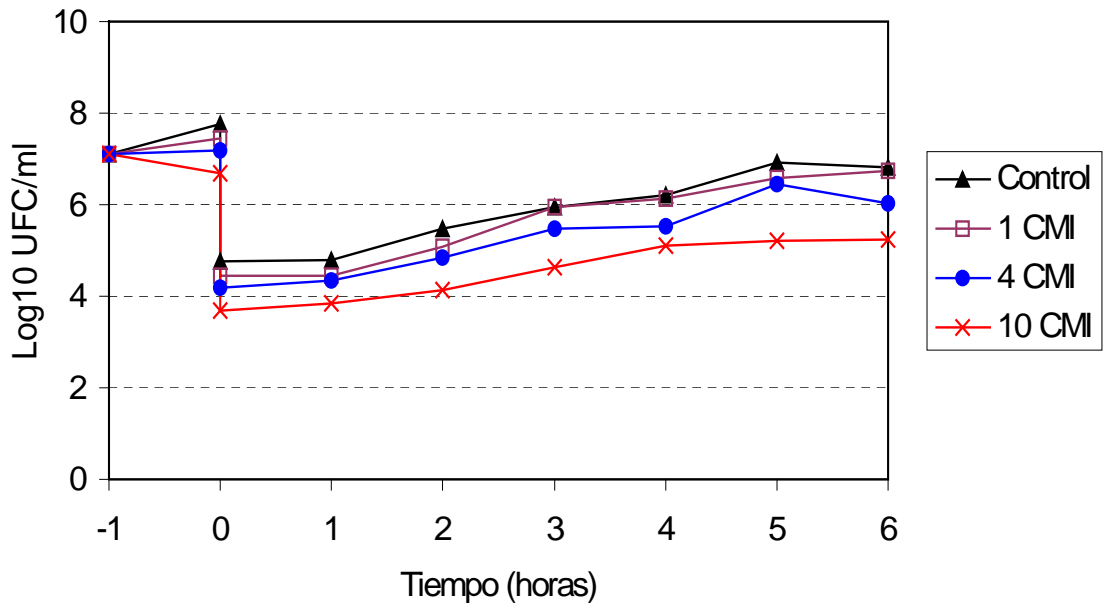


Figura 14. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de rifampicina a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI.

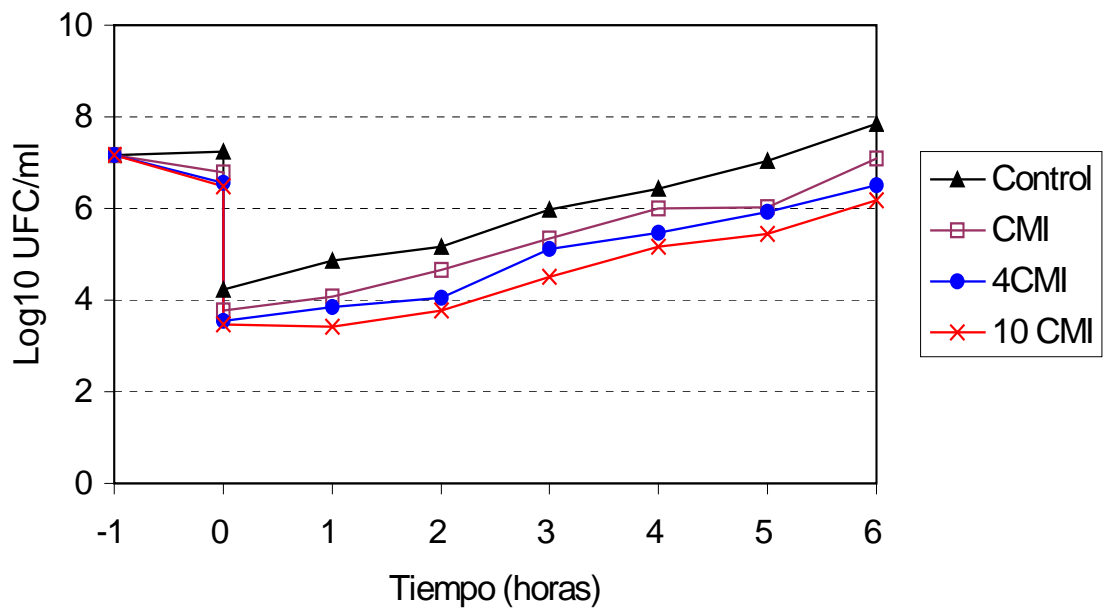


Figura 15. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de claritromicina a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI.

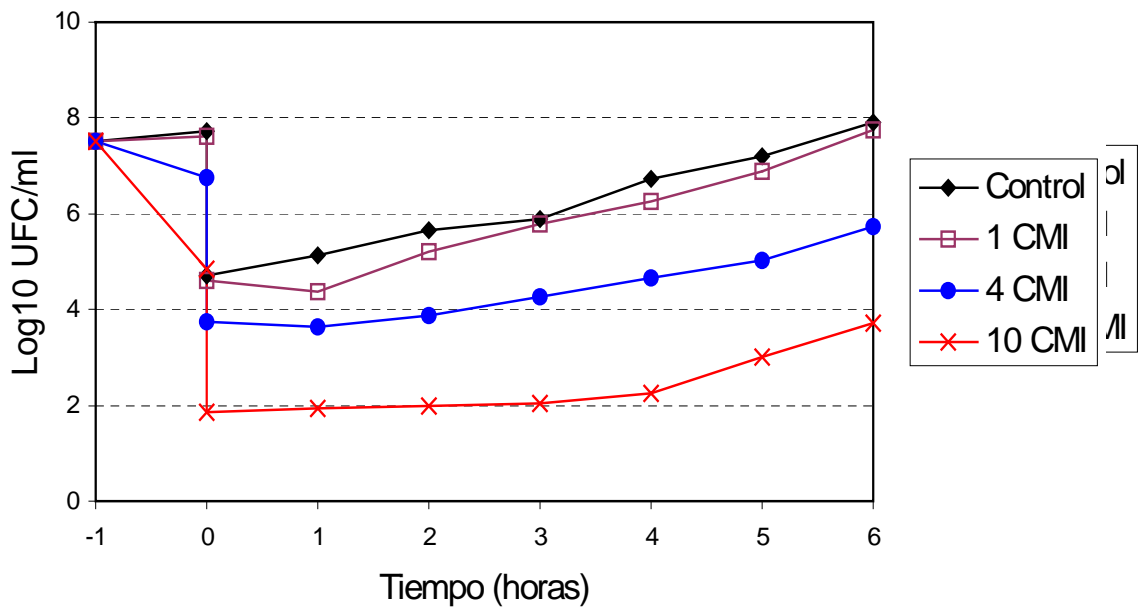


Figura 16. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de ciprofloxacino a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI.

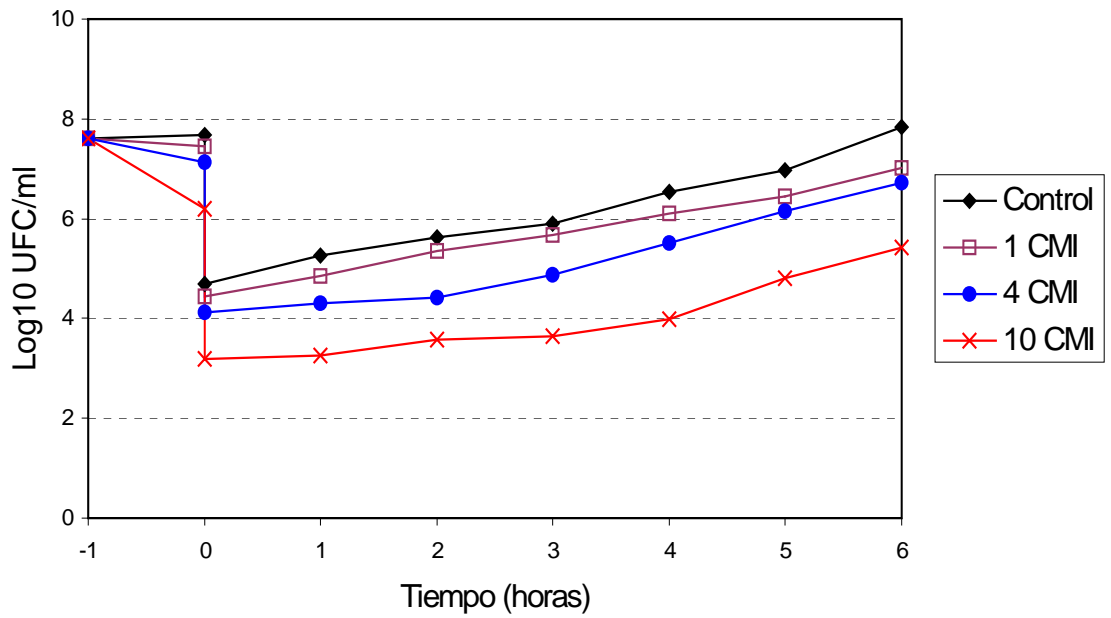


Figura 17. Representación del efecto postantibiótico (EPA) de trovafloxacino a concentraciones de 1, 4 y 10 CMI.

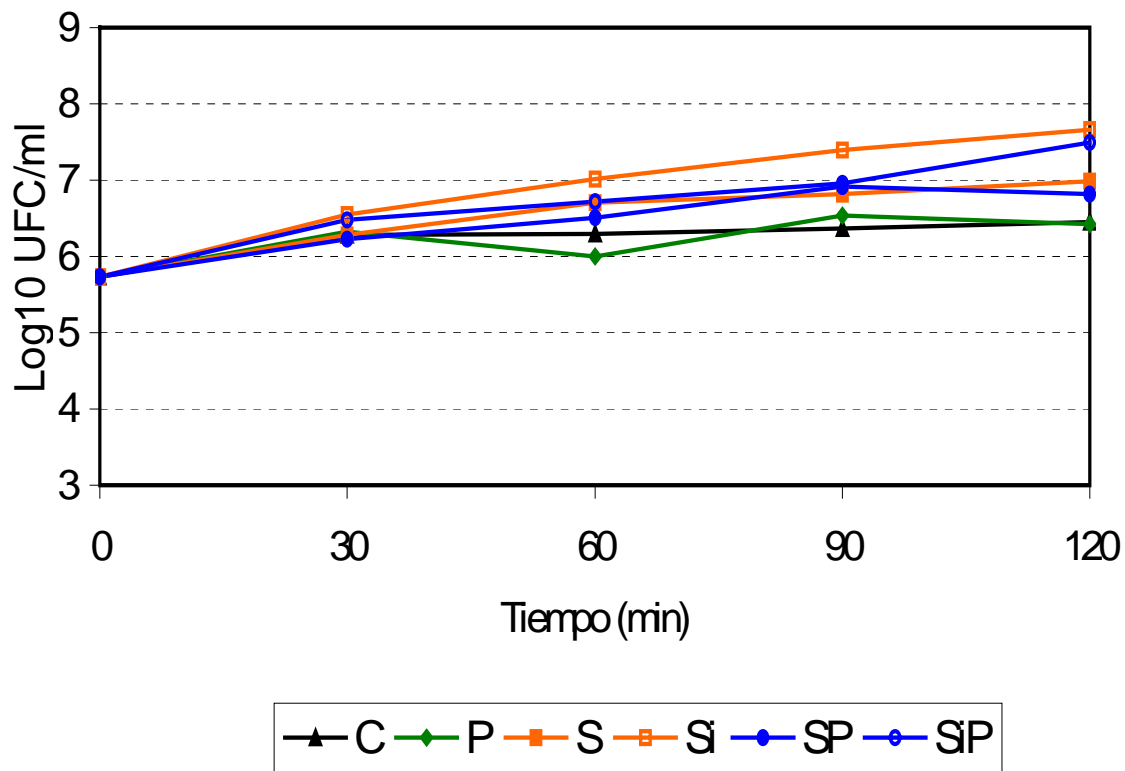


Figura 18. Curvas de muerte de *N. meningitidis* en presencia de suero y leucocitos polimorfonucleares antes de la vacunación (visita basal).

(C = control, P = PMNs, S = suero, Si = suero inactivado, SP = suero + PMNs, SiP = suero inactivado + PMNs).

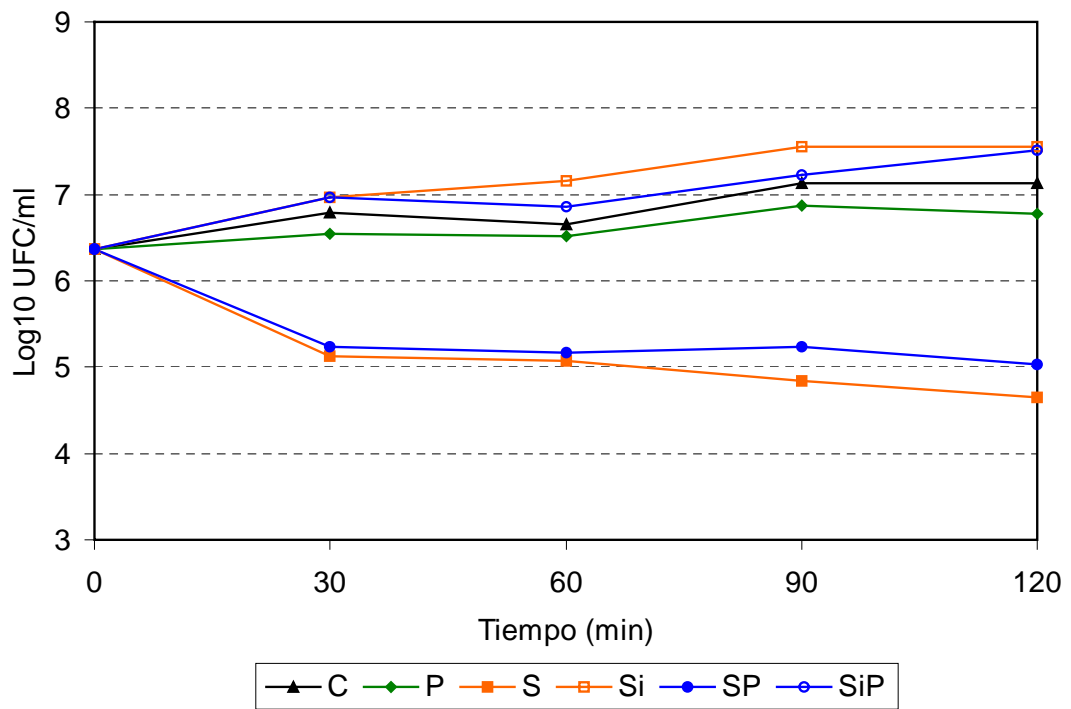


Figura 19. Curvas de muerte de *N. meningitidis* en presencia de suero y leucocitos polimorfonucleares a las 6 semanas de la vacunación (visita 6S).

(C = control, P = PMNs, S = suero, Si = suero inactivado, SP = suero + PMNs, SiP = suero inactivado + PMNs).

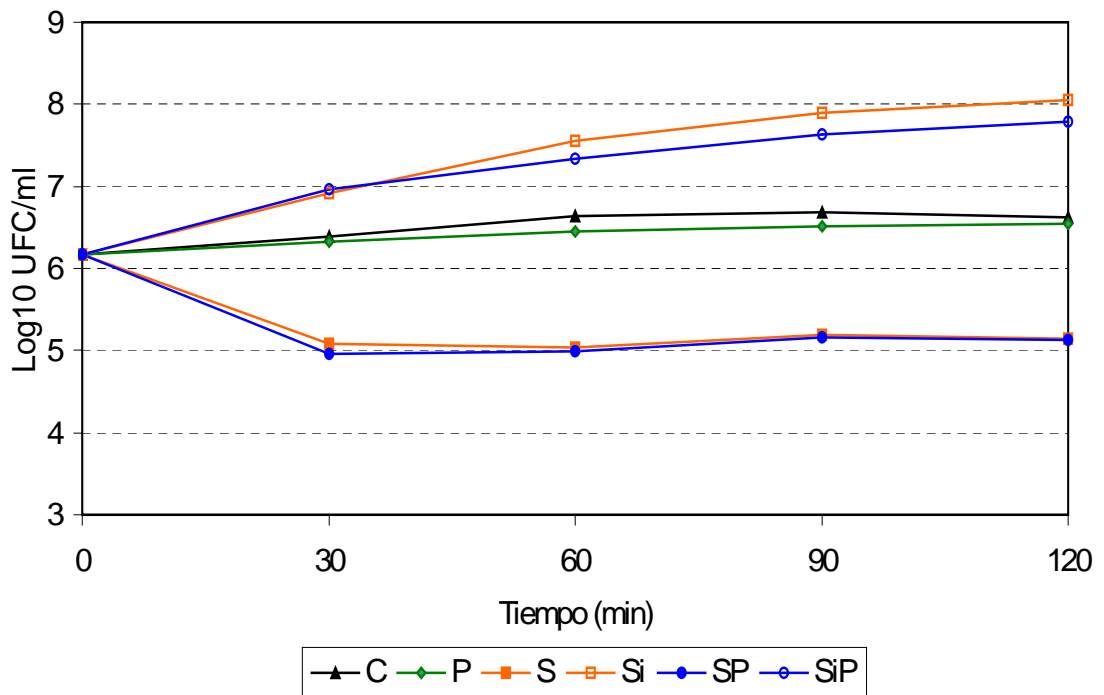


Figura 20. Curvas de muerte de *N. meningitidis* en presencia de suero y leucocitos polimorfonucleares a los 6 meses de la vacunación (visita 6M).

(C = control, P = PMNs, S = suero, Si = suero inactivado, SP = suero + PMNs, SiP = suero inactivado + PMNs).

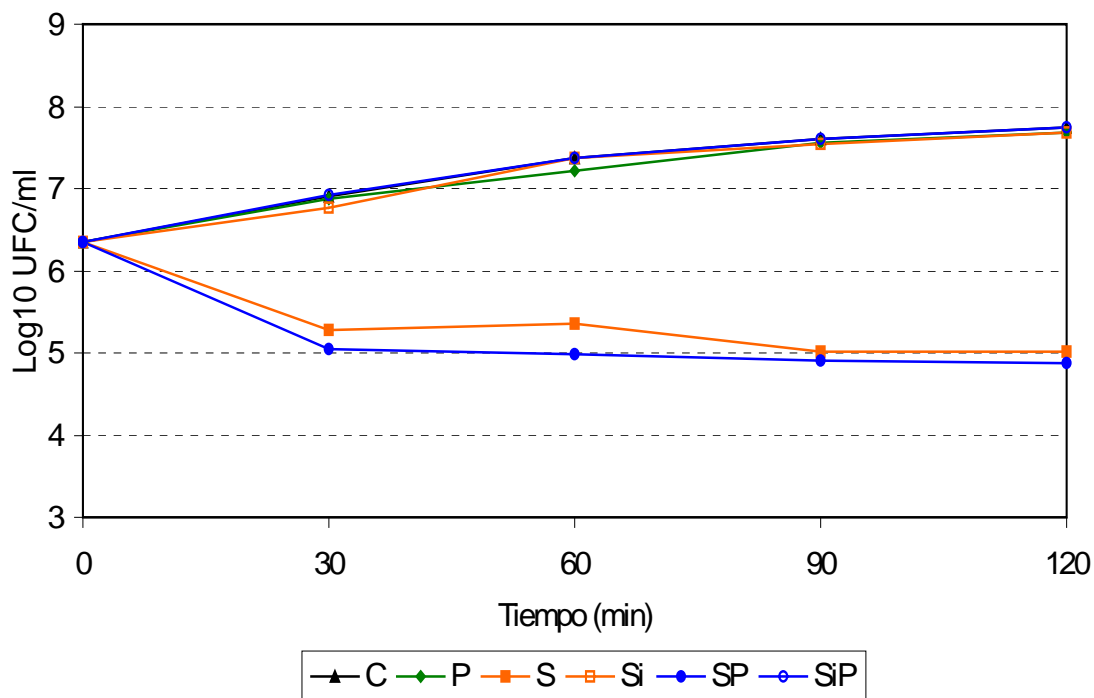


Figura 21. Curvas de muerte de *N. meningitidis* en presencia de suero y leucocitos polimorfonucleares a los 12 meses de la vacunación (visita 12M).

(C = control, P = PMNs, S = suero, Si = suero inactivado, SP = suero + PMNs, SiP = suero inactivado + PMNs).

	CONTROL	PMN	SUERO	SUERO INACTIVADO	SUERO + PMN	SUERO INACTIVADO + PMN
	(C)	(P)	(S)	(Si)	(SP)	(SiP)
BASAL	0,72 ± 1,10	0,69 ± 0,73	1,25 ± 0,61	1,93 ± 0,68	1,08 ± 0,71	1,76 ± 0,52
6ª SEMANA	0,76 ± 0,46 ^a	0,41 ± 0,39	-1,72 ± 1,10 ^a	1,18 ± 0,77	-1,33 ± 0,99 ^a	1,14 ± 0,73
6º MES	0,45 ± 0,66 ^{a, b}	0,37 ± 0,74	-1,02 ± 1,63 ^a	1,88 ± 0,66 ^b	-1,04 ± 1,68 ^a	1,62 ± 0,82
12º MES	1,39 ± 0,52 ^a	1,34 ± 0,42	-1,33 ± 1,43 ^a	1,33 ± 0,66	-1,46 ± 1,39 ^a	1,39 ± 0,52

Tabla 12. Cambios en la viabilidad (media ± D.S.) de *N. meningitidis* sometida a los diferentes tratamientos en cada visita (comparación del inóculo inicial y a los 120 minutos).

^a Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre C y S, SP.

^b Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre C y Si.

	CONTROL	PMNs	SUERO	SUERO INACTIVADO	SUERO + PMNs	SUERO INACTIVADO + PMNs
6 SEMANA	-860,85	-333,29	95,49	-5631,24	88,39	-4205,16
6 MES	-158,72	-211,85	79,95	-25578,91	85,78	-17072,62
12 MES	-6079,94	-3084,62	82,56	-3822,54	95,39	-4424,76

Tabla 13. Porcentaje de reducción del inóculo inicial (% RII) en cada visita, a los 120 minutos del ensayo. Excluidos los casos con RII < 25%.

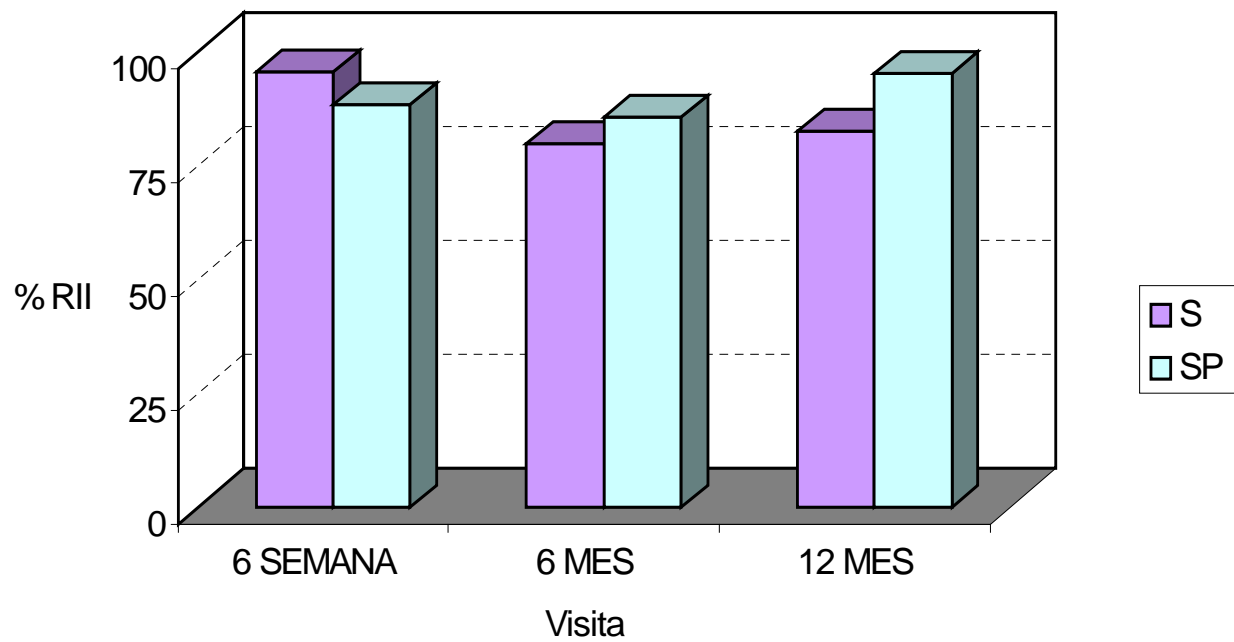


Figura 22. Porcentaje de reducción del inóculo inicial (%RII) de *N. meningitidis* en presencia de suero (S) y suero + PMNs (SP), a los 120 minutos del ensayo en cada visita. Excluidos los casos con RII < 25%.

C	BASAL	6 SEMANA	6 MES	12 MES
BASAL		-0,14	0,35	-0,58
6 SEMANA	0,14		0,49	-0,43
6 MES	-0,35	-0,49		-0,93*
12 MES	0,58	0,43	0,93*	

Tabla 14a. Comparación de la media de las curvas control a lo largo de las visitas. Diferencia de Log₁₀ UFC/ml entre el inóculo inicial y a los 120 min.

* : La diferencia de medias es significativa. P ≤ 0,05.

P	BASAL	6 SEMANA	6 MES	12 MES
BASAL		-1,07 x 10 ⁻²	0,40	-0,55
6 SEMANA	1,07 x 10 ⁻²		0,41	-0,54
6 MES	-0,40	-0,41		-0,96*
12 MES	0,55	0,54	0,96*	

Tabla 14b. Comparación del efecto de los PMNs (P) sobre la reducción del Log₁₀ UFC/ml a lo largo de las visitas.

* : La diferencia de medias es significativa. P ≤ 0,05.

S	BASAL	6 SEMANA	6 MES	12 MES
BASAL		2,47*	2,36*	2,68*
6 SEMANA	-2,47*		-0,10	0,21
6 MES	-2,36*	0,10		0,31
12 MES	-2,68*	-0,21	-0,31	

Tabla 14c. Comparación del efecto del suero (S) sobre la reducción del Log₁₀ UFC/ml a lo largo de las visitas.

* : La diferencia de medias es significativa. P ≤ 0,05.

Si	BASAL	6 SEMANA	6 MES	12 MES
BASAL		0,40	0,13	0,69
6 SEMANA	-0,40		-0,27	0,29
6 MES	-0,13	0,27		0,56
12 MES	-0,69	-0,29	-0,56	

Tabla 14d. Comparación del efecto del suero inactivado (Si) sobre la reducción del Log₁₀ UFC/ml a lo largo de las visitas.

* : La diferencia de medias es significativa. $P \leq 0,05$.

SP	BASAL	6 SEMANA	6 MES	12 MES
BASAL		2,20*	2,21*	2,64*
6 SEMANA	-2,20*		$1,20 \times 10^{-2}$	0,44
6 MES	-2,21*	$-1,20 \times 10^{-2}$		0,43
12 MES	-2,64*	-0,44	-0,43	

Tabla 14e. Comparación del efecto del suero + PMNs (SP) sobre la reducción del Log₁₀ UFC/ml a lo largo de las visitas.

* : La diferencia de medias es significativa. $P \leq 0,05$.

SiP	BASAL	6 SEMANA	6 MES	12 MES
BASAL		0,39	0,18	0,45
6 SEMANA	-0,39		-0,20	$6,94 \times 10^{-2}$
6 MES	-0,18	0,20		0,27
12 MES	-0,45	$-6,94 \times 10^{-2}$	-0,27	

Tabla 14f. Comparación del efecto del suero inactivado + PMNs (SiP) sobre la reducción del Log₁₀ UFC/ml a lo largo de las visitas.

* : La diferencia de medias es significativa. $P \leq 0,05$.

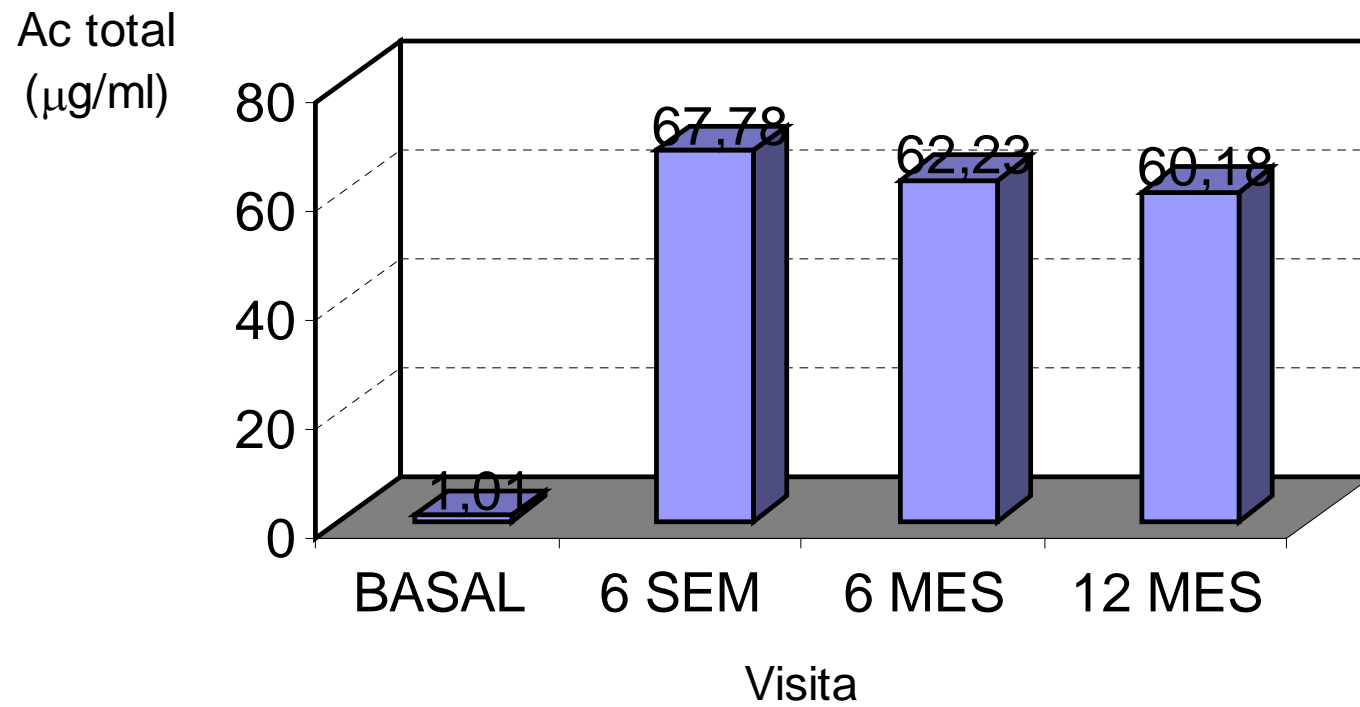


Figura 23. Media de la concentración de anticuerpos totales inducidos a lo largo de las visitas por todos los voluntarios incluidos en el estudio.

Ac bactericidas

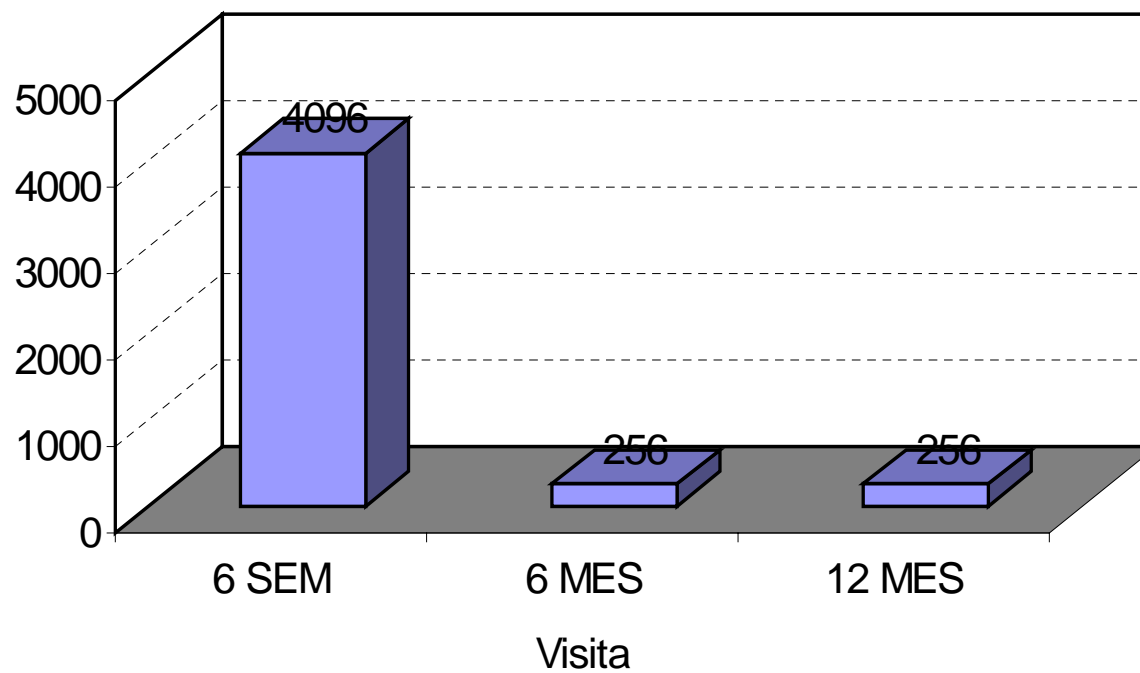


Figura 24. Mediana del título de anticuerpos bactericidas inducido por todos los voluntarios incluidos en el estudio. En la visita basal el título de anticuerpos bactericidas era inferior a 8.

↓Log₁₀ UFC/ml	ANTICUERPOS TOTALES
SUERO (S)	No significativa ^a
SUERO + PMNs (SP)	No significativa ^b

Tabla 15. Correlación entre el nivel de anticuerpos totales y la disminución de las UFC/ml sometidas a la acción del suero en ausencia (S) o presencia de PMN (SP).

^a : Coeficiente de correlación de Pearson = 0,051.

^b : Coeficiente de correlación de Pearson = 0,179.

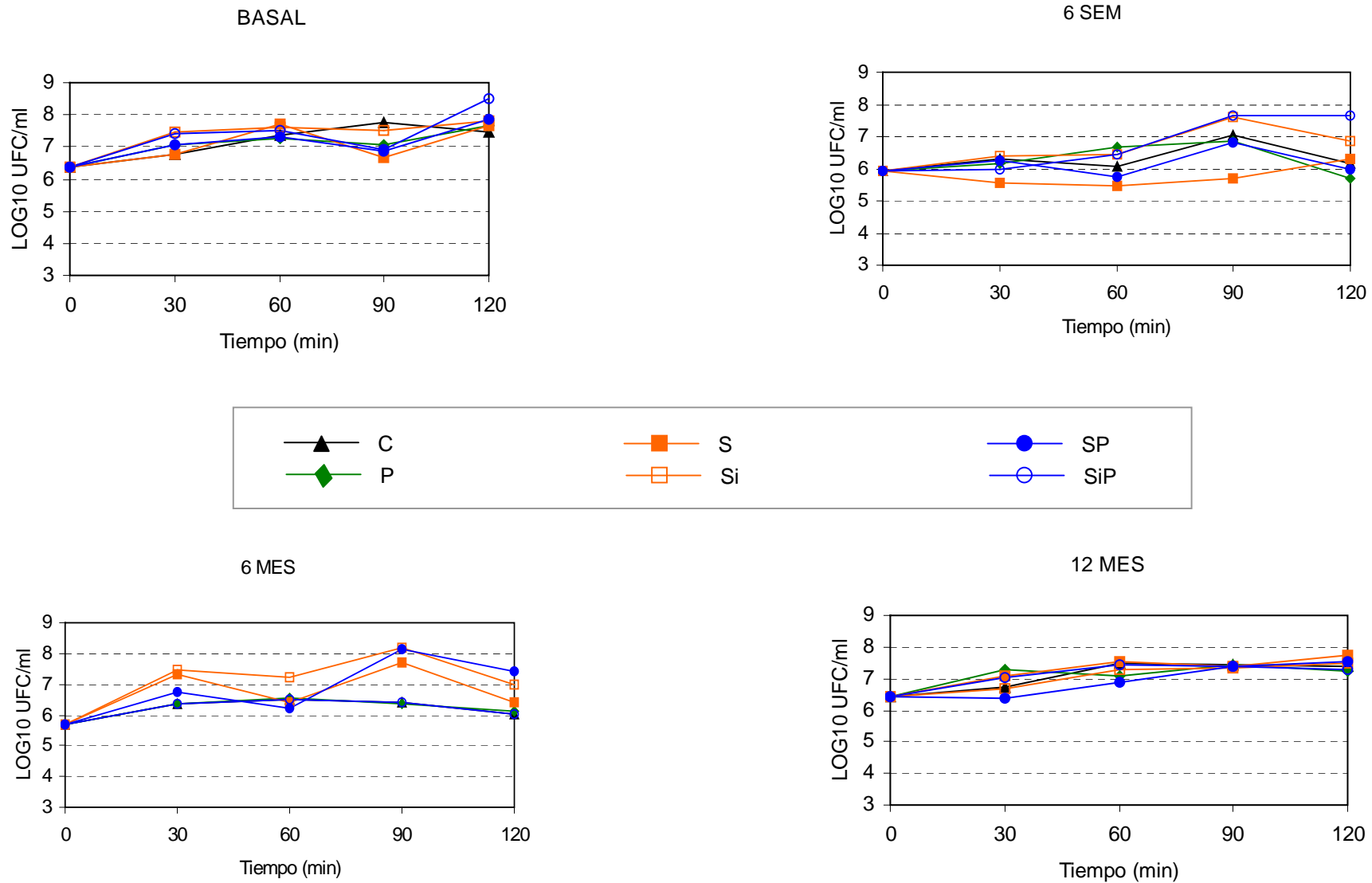


Figura 25. Curvas de muerte de *N. meningitidis* en presencia del suero del voluntario n° 11

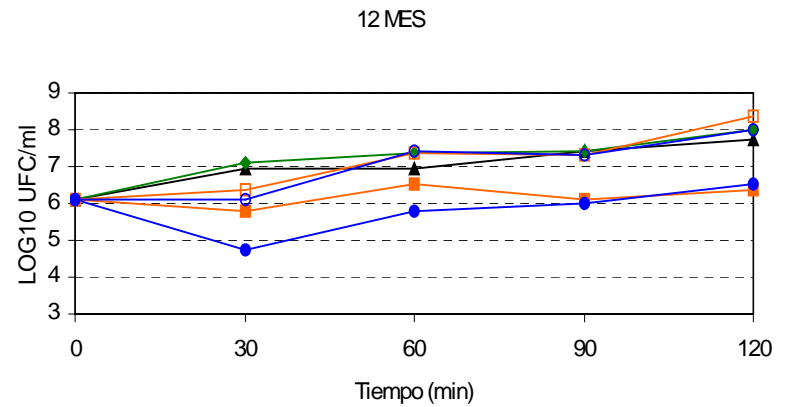
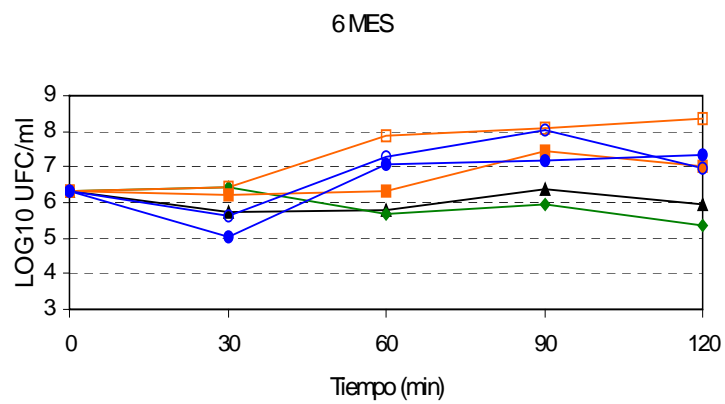
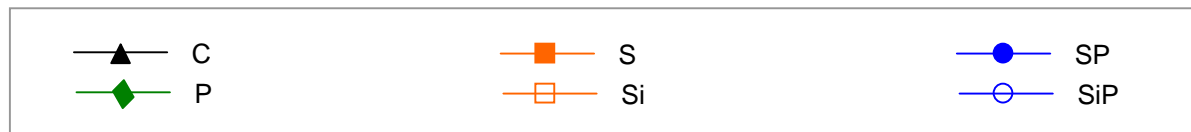
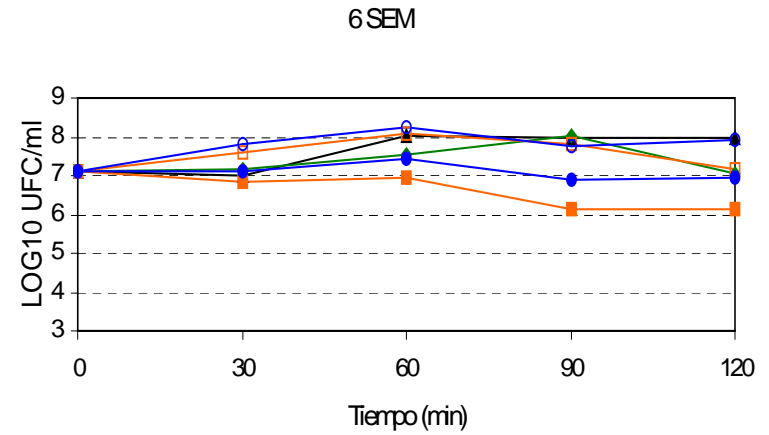
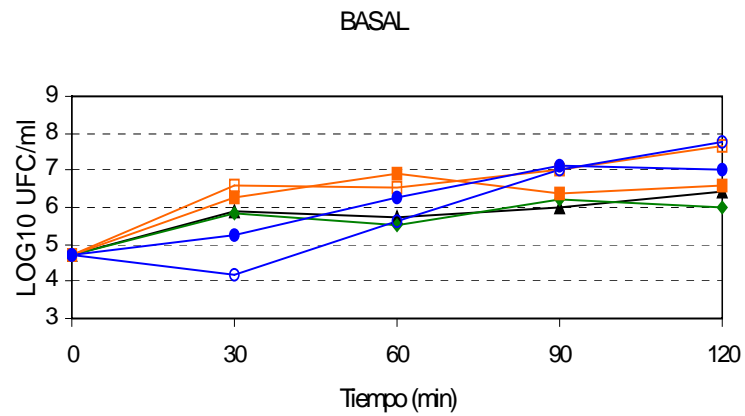
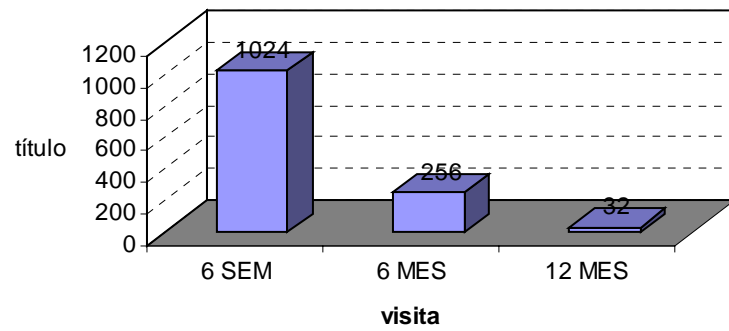
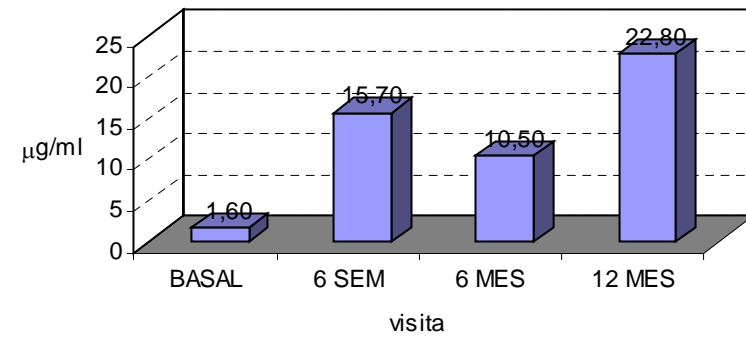


Figura 26. Curvas de muerte de *N. meningitidis* en presencia del suero del voluntario nº 6

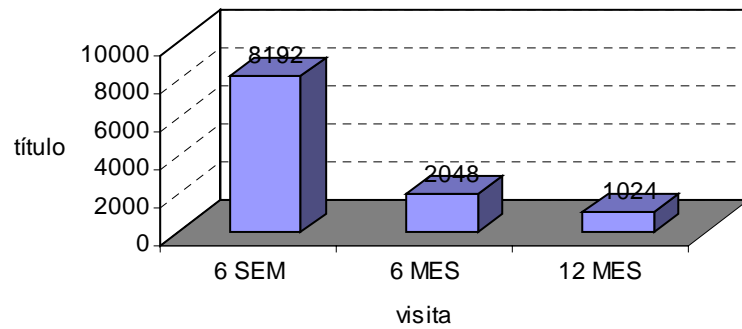
Ac bactericidas vol. 6



Ac totales vol. 6



Ac bactericidas vol. 11



Ac totales vol. 11

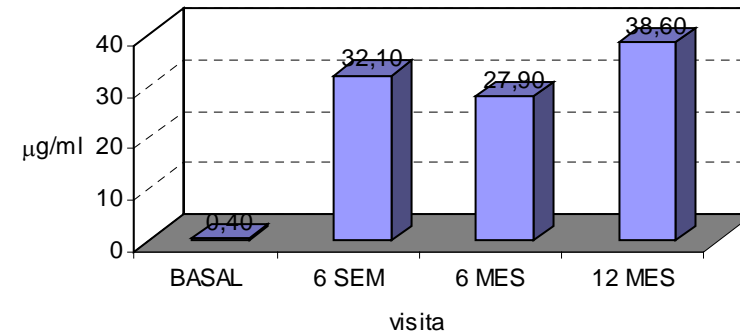


Figura 27. Anticuerpos totales y bactericidas de los voluntarios 6 y 11.

Respuesta a la vacunación

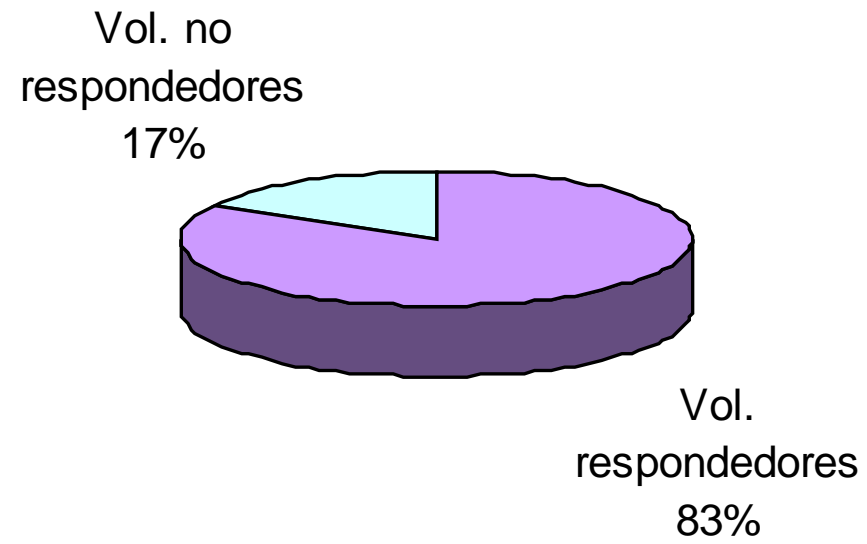


Figura 28. Porcentaje de respondedores a la vacunación con la vacuna de polisacáridos A-C.

VOLUNTARIO	BASAL			6 SEM			6 MES			12 MES		
	Ac bacter	Ac totales	IgA (%)	Ac bacter	Ac totales	IgA (%)	Ac bacter	Ac totales	IgA (%)	Ac bacter	Ac totales	IgA (%)
1	<8	0,9	0	4096	31,2	48	64	12,8	23	128	14,9	18
2	<8	1,9	-	2048	79,5	-	64	46,9	-	128	56,5	-
3	<8	1,7	-	4096	72,8	-	128	37,8	-	256	49,3	-
4	<8	1,4	1	8192	84,8	87	512	62,5	55	256	52,8	53
6*	<8	1,6	6	1024	15,7	48	256	10,5	41	32	22,8	24
8	<8	1,2	0	4096	151,6	100	512	200	71	256	146,3	-
11*	<8	0,4	1	8192	32,1	67	2048	27,9	32	1024	38,6	19
12	<8	1,1	-	2048	44,1	-	64	36,6	-	64	29,1	-
13	<8	0,6	-	8192	40,7	-	256	31,4	-	-	-	-
14	<8	0,4	-	2048	45,7	-	256	39,8	-	256	34,1	-
16	<8	0,16	0	8192	74,5	53	1024	40,5	42	512	51,2	43
17	<8	0,71	3	16384	140,7	89	1024	200	52	1024	166,4	57

Tabla 16. Título de anticuerpos bactericidas, concentración de anticuerpos totales ($\mu\text{g/ml}$) y porcentaje de IgA determinados por ELISA a lo largo del estudio a partir del suero de cada voluntario.

- : No determinado.

* : voluntarios en cuyas curvas de muerte no se aprecia reducción del inóculo inicial.

DISCUSIÓN

1. ELECCIÓN DE LA CEPA BACTERIANA Y ANTIMICROBIANOS

La meningitis bacteriana continúa siendo una de las enfermedades infecciosas con más graves consecuencias. A pesar del desarrollo antibiótico y de disponer de una antibioterapia eficaz, la mortalidad y las secuelas no han sufrido cambios notables (179, 180, 181). Por ello es importante contar con medios preventivos que atajen el desarrollo de la enfermedad y calcular el efecto que pueden tener los diferentes antimicrobianos sobre las bacterias responsables de la misma.

Por otro lado, la infección respiratoria es una de las causas más frecuentes de morbilidad en el ámbito de la Atención Primaria. Los médicos, especialmente los pediatras, ven diariamente resfriados, faringoamigdalitis, etc., muchas de las cuales son víricas, pero una proporción altamente significativa son infecciones bacterianas que, aunque frecuentemente resultan autolimitadas, suelen requerir un tratamiento antimicrobiano. En la práctica diaria, dadas las dificultades de acceso a los estudios microbiológicos correspondientes, no se acostumbra a recurrir a la identificación del o de los patógenos causantes de estas infecciones, estableciéndose tratamientos empíricos que suelen mostrar una buena eficacia en la desaparición de la fiebre y los síntomas específicos de cada enfermedad. Estos tratamientos empíricos deben apoyarse, entre otras cosas, en la etiología más probable del cuadro. En muchas ocasiones un cuadro de meningococemia aguda suele precederse de un episodio de infección respiratoria alta, los pacientes no siempre aparecen con síndrome tóxico en los comienzos y la diferenciación con una infección autolimitada puede ser difícil (182).

Por ello consideramos importante conocer la actividad que fármacos utilizados en el tratamiento de la infección respiratoria de la comunidad pueden tener sobre *Neisseria meningitidis*, ya que el comienzo de la enfermedad meningocócica, al ser sus

síntomas muy inespecíficos, puede confundirse con un proceso respiratorio banal. Además debido a la rápida evolución que en muchos casos puede tener la enfermedad, es necesario contar con los medios adecuados para combatirla en el periodo de tiempo más corto posible. Y en el caso del tratamiento de una infección respiratoria ¿quién nos dice que no estemos eliminando un portador del meningococo?.

Por otro lado, el uso de antimicrobianos en Atención Primaria para el tratamiento de faringitis leves y otros procesos respiratorios banales puede, entre otros factores, controlar o limitar de algún modo la colonización del meningococo en la nasofaringe, primer paso para el establecimiento de la infección. Si estos antimicrobianos fueran capaces de eliminar el microorganismo de la nasofaringe se podría justificar, en parte, el reducido número de casos de meningitis meningocócica declarados en los países desarrollados frente al que presentan los países subdesarrollados, a los que no les es posible el acceso al tratamiento de esos procesos respiratorios.

Por todo ello a la hora de la elección de los antimicrobianos a utilizar en el estudio tuvimos en cuenta estas premisas, y seleccionamos las penicilinas y los macrólidos como antibióticos más administrados de forma empírica en atención primaria (183, 184, 185). Además se ensayaron antimicrobianos utilizados en la quimioprolifaxis de la meningitis meningocócica como son rifampicina y ciprofloxacino, y se comparó la actividad de esta última con la de otra quinolona (trovafloxacino), debido a las expectativas que se crearon en torno a la posibilidad de utilizar este antimicrobiano en el tratamiento de infecciones respiratorias (186) y meningitis (187, 188).

En España, según la información suministrada por el Laboratorio de Referencia del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, se ha observado un cambio en el serogrupo del meningococo predominante, de tal modo que en los últimos años se ha incrementado la incidencia de infección debida a meningococos del grupo C (89). Así, a finales de la década pasada, las cepas de serogrupo C representaron el 58,9% de todos los casos, mientras que las de serogrupo B el 39% (49). La presencia de serogrupos diferentes a estos en nuestro país es anecdótica.

Ante esta situación, se eligió para la realización de este estudio una cepa de *N. meningitidis* perteneciente al serogrupo C, y nos decantamos por la C-11, por ser la recomendada para la determinación de los anticuerpos bactericidas (189).

2. VALORACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS

Hasta hace poco tiempo se utilizaba el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para describir la actividad que un fármaco presentaba frente a una bacteria, pero hoy se cuestiona la validez de su uso para diseñar las pautas antimicrobianas óptimas y se ha puesto de manifiesto la falta de predicción de la CMI tras 24 horas. Esta prueba clásica de sensibilidad antibiótica no tiene en cuenta parámetros farmacodinámicos iniciales con posible relevancia terapéutica (190), por ello es necesario realizar, entre otros, estudios *in vitro* que incluyan curvas de letalidad del antibiótico o su efecto postantibiótico (EPA).

Aunque es difícil predecir con seguridad la evolución clínica de un tratamiento a partir de los datos de su actividad *in vitro*, éste es un factor fundamental y se debe conocer. Así, los test *in vitro* son indicadores aproximados de la situación real de un proceso infeccioso, y los resultados que obtenemos son esenciales para comprender el fenómeno a estudiar. Por ello, la selección del método más apropiado nos beneficiará

con la obtención de unos resultados claros, fiables, y fáciles de extrapolar a la situación *in vivo*.

2.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).

En la mayor parte de los antimicrobianos ensayados no han sido definidos los puntos de corte para *N. meningitidis*. Se han utilizado los establecidos para *N. gonorrhoeae*, cuando ha sido posible (191).

Los valores de CMI hallados distan bastante de las concentraciones a partir de las cuales puede hablarse de resistencia, y son similares a los que se han podido encontrar en la literatura (192, 193), por lo que la cepa seleccionada para el estudio resultó muy sensible a los antimicrobianos utilizados (tabla 1). Independientemente del método usado, microdilución ó macrodilución, los resultados proporcionados por ambas determinaciones no se diferenciaron significativamente (tabla 1), presentando unas concentraciones mínimas inhibitorias muy bajas y que coincidían con las concentraciones mínimas bactericidas para todos los antibióticos, excepto en el caso de claritromicina, donde la CMB resultó uno o dos rangos mayor que la CMI por macrodilución y microdilución, respectivamente (tabla 1).

La actividad del ácido clavulánico parece, en principio, escasa. Este fenómeno estaría en consonancia con lo obtenido por otros autores (194), ya que combinado con amoxicilina no influyó en la actividad de esta última y no se observaron variaciones significativas en la CMI ni en la CMB.

Por todo ello, los niveles de sensibilidad a los antibióticos ensayados en la cepa estudiada, demuestran que podrían eliminar al microorganismo, pero muchos antibióticos a los que el meningococo es sensible en las pruebas de laboratorio no son

capaces de erradicarlo en la nasofaringe (182). Esto es debido a que en las secreciones nasofaríngeas no se consigue una buena penetración y no se alcanzan concentraciones adecuadas para su eliminación, dato a tener en cuenta a la hora de valorar la supresión del estado de portador.

2.2. CURVAS DE LETALIDAD Y SUB-CMI.

La concentración de antimicrobiano utilizada para la realización de estas curvas de letalidad no es la misma, ya que como hemos visto, la cepa poseía diferente sensibilidad a cada antimicrobiano, y siempre se utilizaron concentraciones de $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 4 y 10 veces su CMI, con objeto de que la relación dosis/CMI fuera constante y se pudieran realizar comparaciones.

En la literatura no existen demasiadas referencias de estudios de sensibilidad *in vitro* de los meningococos a diferentes antimicrobianos mediante la determinación de su CMI, pero aún es más reducido el número de publicaciones de este tipo que hagan alusión a estudios de sensibilidad realizados mediante curvas de letalidad, por tanto, la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por otros autores resulta muy difícil.

El estudio de las curvas de letalidad muestra que a las 24 horas todos los antimicrobianos ensayados presentaron actividad bactericida para las concentraciones iguales o superiores a la CMI (1, 4 y 10 CMI), excepto rifampicina que no consiguió efecto bactericida a las concentraciones de 1 y 4 CMI y el ácido clavulánico con 1 CMI (tabla 9).

Si lo que comparamos es la eficacia de los antimicrobianos ensayados (tablas 2-8) y nos fijamos en lo que ocurre tras 8 horas de exposición (tabla I) comprobamos que los betalactámicos son los más eficaces a bajas concentraciones ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1 CMI), mientras que las quinolonas resultan las más efectivas a concentraciones más elevadas (4 y 10 CMI), aunque con resultados similares a los obtenidos por los primeros.

CONCENTRACIÓN	$\frac{1}{4}$ CMI	$\frac{1}{2}$ CMI	1 CMI	4 CMI	10 CMI
ANTIMICROBIANO	A	A/C	A/C	T	CP

Tabla I. Representación de que antimicrobiano produce un mayor descenso de la viabilidad bacteriana tras 8 horas de exposición.

Hay que destacar los buenos resultados obtenidos por los betalactámicos, que se comportan como bactericidas incluso a bajas concentraciones ($\frac{1}{2}$ CMI). De hecho, el estudio de la velocidad de actividad bactericida mostró la existencia de diferencias en cuanto a los distintos antimicrobianos ensayados, de tal manera que la asociación amoxicilina/clavulánico mejoró la actividad de amoxicilina y presentó la mayor velocidad de actividad bactericida de todos y para todas las concentraciones (Tabla 9), a pesar de presentar una CMI (0,06 $\mu\text{g/ml}$) igual o mayor que la de la mayoría de los antimicrobianos ensayados (tabla 1).

Estas diferencias encontradas en la velocidad de actividad bactericida de amoxicilina/clavulánico en comparación con amoxicilina indican la mayor eficacia *in vitro* de la asociación. El hecho adquiere relevancia ante la falta de predicción de la actividad bacteriostática (CMI) tras 24 h, que es igual para ambos fármacos (tabla 1), lo que corrobora lo cuestionado por otros autores sobre la validez del uso de la CMI para

diseñar los regímenes antimicrobianos óptimos (195). Por ello, esta propiedad puede tener importancia ante situaciones en que pueda ser necesaria la optimización de los efectos bactericidas (196), ya que en algunas infecciones se considera globalmente que una velocidad alta de muerte provocada se correlaciona bien con éxito terapéutico (197).

Una posible explicación a este hecho sería que el ácido clavulánico aceleraría *in vitro* la actividad bactericida de amoxicilina frente al meningococo. Este efecto podría ser debido a la unión selectiva del ácido clavulánico a alguna de las PBPs, causando alteraciones en la pared de peptidoglicano y la lisis prematura del meningococo, contribuyendo al efecto sinérgico de las penicilinas, a modo de lo que se ha observado para otros microorganismos (198).

Por otro lado, cabría esperar que un aumento en la concentración de antimicrobiano se tradujera en un mayor efecto antibacteriano, pero nosotros observamos que esto no siempre ocurría. Así, con los betalactámicos (amoxicilina y amoxicilina/clavulánico) se logra una similar actividad bactericida con todas las concentraciones ensayadas capaces de eliminar al microorganismo (figuras 2 y 3), lo que demuestra su escasa concentración-dependencia como se ha visto con anterioridad (199). Por el contrario, en el caso de las quinolonas, claritromicina y rifampicina si se aprecian estas diferencias, de tal manera que al ir aumentando la concentración de antimicrobiano el efecto antibacteriano es mayor (tabla 10), lo cual no implica que se consiga antes la actividad bactericida, ya que claritromicina, independientemente de la concentración no consigue eliminar al 99,9% de los microorganismos hasta las 24 horas del ensayo (tabla 9), momento en el cual, su actividad y resultados son comparables a los obtenidos por los betalactámicos.

Claritromicina es el único antimicrobiano ensayado en el que no existe coincidencia entre la CMI y la CMB (tabla 1). En otros trabajos se ha comprobado que este compuesto, considerado en principio como bacteriostático, puede comportarse como bactericida según las características del microorganismo, las concentraciones del antibiótico y el tiempo de exposición (146). A la vista de los resultados obtenidos en nuestro estudio, claritromicina confirmaría este hecho, ya que se comportaría de los dos modos. Así, a las 8 horas del ensayo no habría alcanzado la actividad bactericida, comportándose entonces como bacteriostático. A las 24 horas ya habría eliminado el 99,9% de los microorganismos, comportándose entonces como bactericida (tabla 9). El mismo resultado se observó en un estudio realizado con cocos gramnegativos, donde no se obtuvo actividad bactericida a las 6 horas de incubación, pero tras 24 horas se logró una reducción de más del 99,9%, incluso con las concentraciones más bajas (200), como ocurre en nuestro ensayo.

Por otro lado, claritromicina muestra actividad bactericida a concentraciones que se pueden alcanzar en humanos. Gracias a la excelente penetración en tejidos y secreciones de las vías respiratorias, donde consigue concentraciones de $5,8 \pm 0,9$ mg/l con dosis de 500 mg (201), y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestro estudio, este fármaco podría ser capaz de eliminar el meningococo de la nasofaringe, tras su administración empírica en situaciones de infección respiratoria. Y si además tenemos en cuenta que su actividad parece sinérgica con la de su principal metabolito en el hombre, la 14-hidroxiclaritromicina, podemos pensar que esta aún mejoraría *in vivo*, como ocurre frente a otros microorganismos (156).

Como han obtenido otros autores (202), la actividad de las quinolonas ensayadas es elevada y comparable a la de los betalactámicos, con la ventaja de que las primeras no solo son muy activas *in vitro* frente a *N. meningitidis*, incluso frente a cepas no sensibles a las penicilinas (203, 204), sino que además conseguirían alcanzar, tanto ciprofloxacino (134) como trovafloxacino concentraciones nasofaríngeas por encima de su CMI. De hecho, ciprofloxacino es antibiótico de elección en la quimioprolifaxis de la meningitis meningocócica. Y debido a las expectativas creadas en torno a la utilización de estas modernas quinolonas en el tratamiento de las infecciones respiratorias (186), pensamos que podrían ser capaces de eliminar posibles portadores del meningococo.

Mientras, según los datos encontrados en la literatura, las penicilinas presentan menores tasas de penetración en secreciones (201), característica importante para la eliminación de este microorganismo en su hábitat natural (182). No obstante, si comparamos las concentraciones alcanzadas por amoxicilina tras dosis habituales en secreciones de las vías respiratorias ($3,2 \pm 1,6$ mg/l) (201), con la CMI obtenida en nuestro estudio (0,06 mg/l), comprobamos que esos valores superan con mucho el de la CMI, de modo que podrían alcanzarse en esas secreciones concentraciones capaces de eliminar a los meningococos sensibles, a pesar de la baja penetración que parecen presentar las penicilinas.

En cuanto a rifampicina, comprobamos que a pesar de la gran sensibilidad que presenta nuestra cepa a este antimicrobiano (tabla 1), el fármaco solo alcanza la actividad bactericida tras 6 horas de incubación y a altas concentraciones (10 CMI), obteniéndose en este momento disminuciones del inóculo muy similares a las obtenidas por amoxicilina en las mismas condiciones (tablas 2 y 6). Sin embargo, gracias a su

excelente penetración (205), se alcanzan en nasofaringe niveles capaces de eliminar al microorganismo (206). Así, en la actualidad la rifampicina es el antibiótico de más amplio uso en la profilaxis antimeningocócica (207). A pesar de ello, se han descrito fracasos tras su administración, debido a la aparición de cepas de meningococo rifampicín-resistentes (208), hecho que suele ocurrir tras un amplio uso del fármaco (209).

De esta manera y de igual modo a lo que ocurre con los antibióticos administrados en la quimioprofilaxis, cabría preguntarse si el tratamiento de las infecciones respiratorias con estos antimicrobianos puede afectar a la sensibilidad de los meningococos que colonizan la nasofaringe. Ya que este hecho podría favorecer que en bacterias como *N. meningitidis*, se seleccionaran cepas resistentes a dichos antimicrobianos. Por ello consideramos importante hacer un seguimiento de los niveles de sensibilidad a estos antibióticos debido a su uso en el tratamiento de infecciones respiratorias.

2.3. EFECTO POSTANTIBIÓTICO

En el estudio del efecto postantibiótico, para los betalactámicos observamos EPAs no significativos (menores de 0,5 horas) e incluso negativos en el caso del ácido clavulánico. Además para estos antimicrobianos, el aumento de la concentración no implicó un aumento del EPA (tabla 11), como ya se ha descrito previamente para estos fármacos y los gramnegativos (210). Y por otro lado la combinación de amoxicilina y ácido clavulánico no presentó ningún efecto sobre el EPA individual de los mismos (tabla 11).

No ha sido posible encontrar en la literatura estudios que hagan referencia al EPA con *N. meningitidis*. La mayoría de los datos encontrados para los betalactámicos seleccionados con bacterias gramnegativas indican que se producen EPAs pequeños o nulos e indiferentes al aumento de la concentración del antimicrobiano. Nuestros resultados están en consonancia con lo ya observado por estos autores (173, 211, 212, 213, 214). Craig, obtuvo EPA nulo e incluso negativo tras la exposición de cepas estándar de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes betalactámicos (195). Pero en algunos trabajos se defiende la idea de que la ausencia de EPA de algunas penicilinas frente a gramnegativos puede deberse a una exposición al antimicrobiano a concentraciones demasiado bajas y durante periodos de tiempo demasiado cortos (215). De esta manera el EPA de los betalactámicos en los gramnegativos se prolongaría con exposiciones al fármaco mayores de 2 horas, hecho que en nuestro estudio no se contempla, ya que la eliminación del antimicrobiano se realizó tras 1 hora de incubación.

Así mismo hemos comprobado en el estudio de las curvas de letalidad que el ácido clavulánico ejerce un efecto complementario cuando se combina con amoxicilina, de forma que esta combinación resulta más efectiva *in vitro* frente al meningococo que cuando se ensayan ambos por separado. Pero ahora vemos que esta sinergia no existe en el estudio del EPA, ya que la adición de la sal potásica no influye de manera visible en la actividad de amoxicilina, y no prolonga su efecto postantibiótico (tabla 11). Gould y colaboradores han comprobado que para gramnegativos amoxicilina/clavulánico a concentraciones de 10 CMI no prolonga el EPA con respecto al inducido por amoxicilina. Pero a concentraciones elevadas (100 CMI) el clavulánico si parece mostrar una sinergia con amoxicilina, pues se consigue la prolongación de este efecto en casi 2 horas (216). Las concentraciones que se ensayaron en nuestro estudio no nos

permiten comprobar esto para el meningococo, pero obtenemos resultados similares con 10 CMI.

Por otro lado, sobre las bacterias gramnegativas, los inhibidores de proteínas y ácidos nucleicos producen EPAs de varias horas de duración (172), pero frente a nuestra cepa, tanto claritromicina como rifampicina necesitan concentraciones de 10 CMI para inducir EPAs apenas significativos (0,6 horas). No obstante se comprueba que el aumento de la concentración produce también un aumento del EPA, ya que a concentraciones iguales a la CMI se obtienen EPAs nulos, que se traducen en positivos a concentraciones superiores (tabla 11).

Los únicos antimicrobianos capaces de inducir un EPA significativo (mayor de 0,5 horas) en la cepa ensayada son las quinolonas, que a concentraciones de 4 y 10 veces la CMI retardan el crecimiento en más de 1 hora (tabla 11). Esto concuerda con los resultados obtenidos hasta el momento sobre el estudio del efecto postantibiótico, que destacan el hecho de que estos antimicrobianos presenten un EPA de larga duración frente a organismos gramnegativos (173, 217).

Por otro lado, tanto para ciprofloxacino como para trovafloxacino se observa una relación entre la concentración de antimicrobiano y la duración del EPA, siendo esta mayor a medida que aumenta la concentración del mismo. Se confirma de este modo que el EPA y su duración están correlacionados con la concentración ensayada de antimicrobiano, lo cuál está de acuerdo con lo observado en otros estudios (173, 218, 219).

Como se ha señalado anteriormente, no hemos podido encontrar en la literatura estudios que hagan referencia al EPA con *N. meningitidis*, y es que esta bacteria no figura entre los microorganismos que presentan efecto postantibiótico (172). No

obstante, debemos tener en cuenta que existe una gran variedad de factores que pueden alterar la presencia y/o duración del mismo. Estos factores están relacionados con el microorganismo, el antimicrobiano, y con las condiciones experimentales. En general, se puede decir que todos los factores que influyen en la actividad del antibiótico influyen en la duración del EPA. Se sabe que el suplemento de cationes en el medio produce reducción del EPA y un considerable aumento de la CMI y CMB (210). La concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} en cantidades fácilmente superables en suero y líquidos orgánicos, influye sobre el EPA de los antimicrobianos, de hecho, el Mg^{2+} es el catión más importante en la reducción del EPA y de la actividad bactericida de las quinolonas, ya que puede provocar un incremento en la eficacia de la ADN-girasa bacteriana y por lo tanto disminuir la eficacia de estos fármacos (220). Ambos cationes se incluían en el medio de cultivo de nuestro microorganismo.

Por otro lado la presencia de albúmina, aunque poco estudiada, parece que también incrementa la CMI y disminuye la duración del EPA (221).

Pero además de estos factores, otros como son el medio de cultivo, el pH, la concentración del inóculo inicial, la fase de crecimiento, la concentración de antimicrobiano, el tiempo de exposición, el método de eliminación del antimicrobiano, y el método de cuantificación también repercuten en el retraso del crecimiento.

A esto hay que añadir que el EPA es siempre más prolongado *in vivo* que *in vitro* porque el tiempo de generación bacteriano en los animales y en el hombre es más lento y, además, en los seres vivos se cuenta con la presencia de PMN y otros mecanismos defensivos que ayudan al antibiótico en su acción.

Por otro lado, el mecanismo preciso por el que se establece el EPA aun no es del todo conocido, pero parece ser que están implicados diversos factores. Aunque el término EPA fue definido para enfatizar el hecho de que la previa exposición al fármaco

es la causante del fenómeno, otras teorías se inclinan a destacar el papel de las concentraciones subinhibitorias del antibiótico, al que están expuestas las bacterias tras su eliminación del medio, y proponen que los estudios sobre el EPA se hagan a concentraciones inferiores a la CMI (218).

Se considera un fenómeno que se desarrolla fundamentalmente dependiendo de la combinación antimicrobiano-microorganismo y, en muchos casos, es multifactorial. Se asume que el EPA es el resultado de la inhibición del crecimiento bacteriano como consecuencia de una prolongación del tiempo de latencia. Sin embargo, podría deberse a un aumento en el tiempo de generación o, incluso, una combinación de ambos. El segmento de la fase de crecimiento que está afectada puede calcularse tomando muestras a intervalos muy cortos. Esto ha revelado que en la mayoría de los casos sucede realmente una prolongación de la fase de latencia, excepto para determinados antibióticos, como ciprofloxacino, que parece que induce una prolongación en el tiempo de generación (222).

Las bases que explican el EPA, como se ha mencionado, aún no se conocen con precisión, pero existen varias teorías que tratan de explicar este fenómeno.

La duración del efecto postantibiótico podría estar relacionada con la persistencia del fármaco en la diana de acción. En este sentido varios autores sugieren que el tiempo necesario para la liberación del antibiótico de sus receptores sería el tiempo de recuperación del crecimiento bacteriano (217). Esta explicación se ha propuesto para el caso de las quinolonas, y se ha sugerido que el EPA estaría condicionado por el tiempo que estas tardan en disociarse de sus receptores y difundir fuera de la bacteria (223).

La reparación del daño no letal de las estructuras bacterianas, tiempo de resíntesis de las proteínas y enzimas afectados por la acción del fármaco, es otra de las

teorías que se apuntan (224). En esta línea podrían encuadrarse los betalactámicos (225). Hasta hace relativamente poco tiempo se consideraba que esos antimicrobianos producían un EPA sobre los grampositivos, pero no sobre los gramnegativos. Sin embargo, algunas penicilinas a elevadas concentraciones (215, 226) y los carbapenemes si parecen inducir un EPA sobre ambas clases de microorganismos.

Los betalactámicos se fijan a varias PBPs presentes en la membrana citoplásmica (la PBP₂ en el caso del meningococo), e inducen la formación de esferoplastos. El EPA podría en estos casos reflejar el tiempo requerido por los esferoplastos para resintetizar su pared (211), ya que antes no pueden dividirse. Otra alternativa sería que el EPA representara el período en el que la bacteria resintetiza nuevas PBPs o el efecto del antimicrobiano que persiste, el cual continúa inhibiendo la actividad de las enzimas recién sintetizadas (227). Pero cabe también que el EPA sea el período en el que la célula regenera la actividad enzimática después de que el antibiótico se haya liberado desde las dianas. El rango de síntesis de las nuevas enzimas variará según el tipo de bacterias y dentro de cada bacteria, lo que explicaría las diferencias entre unos organismos y otros en sus tiempos de EPA (228).

Por consiguiente, creemos que se debe tender a interrelacionar una serie de datos y conocimientos como son la dosis, farmacodinamia, CMI de la bacteria, EPA y su relación con el área bajo la curva (AUC), y las enfermedades de base del enfermo junto con sus factores de riesgo a la adquisición de las mismas, para así conseguir un mejor uso de los antibióticos.

3. VALORACIÓN DE LA INMUNIZACIÓN

Desde la década de los sesenta se demostró la eficacia de la vacuna con polisacáridos del serogrupo C para prevenir los frecuentes brotes de enfermedad meningocócica que se producían en los reclutas americanos (68). Trabajos más recientes han confirmado el mantenimiento de la eficacia de este tipo de vacunas para determinados grupos de edad (78, 79). Pero a pesar de demostrarse su eficacia en el control de epidemias, la vacunación frente al meningococo grupo C parece no inducir una respuesta de anticuerpos anticapsulares suficiente, no existiendo datos que demuestren qué nivel de anticuerpos resulta protector (65). Esto refleja en parte, un conocimiento incompleto de la respuesta inmunológica frente al meningococo.

Por otro lado, la falta de estudios en sujetos sanos hace que no se conozca con claridad cual es el mejor predictor de protección: la muerte por fagocitosis o la inducida por los anticuerpos bactericidas, que en último caso, dependerá de los epítomos antigénicos a los que van dirigidos (229).

Nuestro estudio incluye el seguimiento de sujetos sanos vacunados, midiendo a lo largo del tiempo post-vacunación los títulos de anticuerpos y la muerte ex vivo por fagocitosis (en presencia de suero normal y suero inactivado) de *N. meningitidis* serogrupo C11, para intentar aclarar el peso específico de cada factor protector.

En la visita basal (figura 18) el estudio de las curvas de muerte de *N. meningitidis* nos permite observar que los distintos tratamientos no provocaron una disminución en las UFC/ml, como era de esperar, debido a la ausencia de anticuerpos frente al microorganismo en este momento. Por el contrario se apreció un aumento de las mismas favorecido por la presencia de suero. La existencia en él de nutrientes

esenciales tales como el hierro, fomentaría el desarrollo y multiplicación del meningococo, que es capaz de captar este metal mediante las proteínas IROMP a partir de la transferrina (230) y lactoferrina (321) humanas. Además, la presencia de proteínas séricas como la albúmina, evitarían la acción inhibidora de los ácidos grasos contenidos en el medio de cultivo (232), promoviendo también el desarrollo de la bacteria.

Tras la vacunación se observa una reducción del inóculo inicial considerable. De este modo podemos afirmar que la administración de la vacuna divalente ha inducido una mejora significativa en las curvas de muerte bacteriana (tablas 14a-14f), de forma que el meningococo del grupo C fue eliminado del medio, disminuyendo su concentración en más del 80% en los ensayos realizados (figura 22). Estos datos coinciden con otros estudios llevados a cabo en muestras de población similares a la nuestra, donde la administración de la vacuna de polisacáridos supuso unos resultados parecidos (92), incluso para sujetos deficientes en algún factor del sistema de complemento (65).

Al detenernos en dichas curvas observamos, que no todos los tratamientos son capaces de reducir las UFC/ml (figuras 19-21). La contribución a la eliminación del meningococo de opsoninas termo-lábiles (presumiblemente el complemento) se examinó en los tratamientos con suero inactivado. Bajo las condiciones de dicho tratamiento no se induce esa reducción. Solamente cuando sometemos a *N. meningitidis* al tratamiento con suero normal, bien sea en presencia (SP) o ausencia de PMNs (S) se aprecia el descenso.

Además, a la vista de nuestros resultados, la existencia de PMNs no parece influir en la eliminación del meningococo del medio (tabla 12), de modo que la

disminución en las curvas de muerte puede atribuirse a la actividad bactericida del suero más que a la fagocitosis realizada por los PMNs, ya que no obtuvimos diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguna de las visitas entre las curvas S y SP (tabla 12), obteniéndose reducciones similares para ambas (tabla 13).

Estos resultados difieren de los observados por Roberts (233), quien en presencia de suero (10%) de voluntarios sanos inmunizados, obtuvo un incremento en la eliminación del meningococo debido a la actividad granulocítica, mientras que el microorganismo se vió poco afectado por la actividad bactericida del suero.

No obstante, parece que la fagocitosis llevada a cabo por los neutrófilos en el suero de adultos sanos varía con el serogrupo de la bacteria. De este modo Ross comprobó que la fagocitosis jugaba un papel relativamente importante en la eliminación de los serogrupos B y 29E, pero no fue tan importante en la eliminación de otros como el serogrupo C (234). Y es más, parece que meningococos pertenecientes al mismo serogrupo no son fagocitados de la misma forma por los PMNs, lo que sugiere la existencia de otros elementos que medien en el proceso. De este modo factores como la cantidad de polisacárido capsular, la concentración de anticuerpos, la especificidad, el isotipo, la unión de C3, o la existencia de anticuerpos dirigidos a antígenos no capsulares podrían influir en la fagocitosis y contribuir a marcar las diferencias en cuanto a la susceptibilidad de un serogrupo determinado a dicho proceso.

En este sentido estudios recientes (235) apuntan la posibilidad de que exista una relación entre la fagocitosis y el fenómeno de sialización del LOS y de la cápsula. Ya que se ha encontrado que varias cepas pertenecientes al mismo serogrupo, el serogrupo C concretamente, no resultaron uniformemente resistentes a la fagocitosis. En este estudio la supervivencia de las resistentes se correlacionaba directamente con la cantidad de ácido siálico presente en el LOS y en la cápsula.

Por otro lado, parece que la expresión de ciertas proteínas de la membrana externa denominadas Opa (*Opacity-associated proteins*), identificadas también en *N. gonorrhoeae* (236, 237, 238), influyen de manera decisiva en la fagocitosis del meningococo, favoreciéndola hasta tal punto que el proceso puede ocurrir incluso en ausencia de anticuerpos y complemento (239).

La cápsula de polisacáridos tiene, posiblemente, un importante papel antifagocítico, confiriendo a la bacteria una mayor resistencia. Por otro lado, y de acuerdo con lo anteriormente expuesto, nuestra cepa por pertenecer al serogrupo C resultaría más resistente que otros serogrupos a la muerte por fagocitosis, y además, presuponemos que podría contar con una cantidad de ácido siálico tal, en el LOS y en la cápsula, que le proporcionaría mayor resistencia a la fagocitosis, constituyendo de este modo un mecanismo de evasión frente a los PMNs, y justificando así nuestro resultados.

Por otro lado, Schlesinger obtuvo que tras la inmunización con la vacuna de polisacáridos la actividad fagocítica en presencia de suero era mucho más eficiente que en presencia de suero inactivado (65), sugiriendo esto la posible contribución de C3b al proceso de muerte del microorganismo.

En nuestro caso, como ya se ha señalado, lo que promueve la destrucción de la bacteria tras la vacunación, es la presencia de suero normal, donde el sistema de complemento estaría intacto. Por lo que el mecanismo de esta eliminación podemos atribuirlo a la presencia de anticuerpos que activarían, por la vía clásica mayoritariamente, la cascada del complemento y la lisis del microorganismo mediante el complejo de ataque a membrana (figura II). La presencia de la bacteria a través del

LPS también sería capaz de inducir la activación de la vía alternativa, lo que podría estar facilitado por IgG (234).

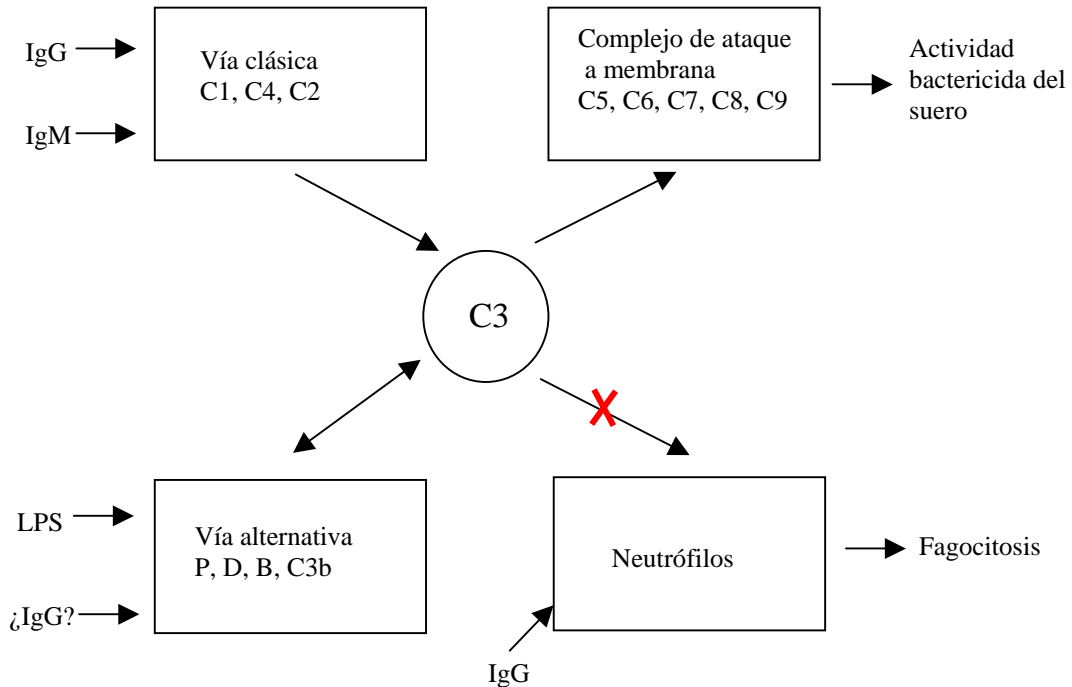


Figura II. Modelo de interacción del meningococo con los mecanismos de defensa del hospedador (234).

Este fenómeno no se observó antes de la vacunación donde, como ya se ha señalado, el suero de los voluntarios fue incapaz de eliminar al meningococo (figura 18), contando con una concentración de anticuerpos totales determinados por ELISA de 1,01 $\mu\text{g/ml}$ y un título de anticuerpos bactericidas inferior a 8. Este nivel de anticuerpos totales pre-vacunación resultó más bajo que el obtenido por otros autores (2,5-2,9 $\mu\text{g/ml}$) en estudios anteriores (76, 240).

De igual modo, la disminución que experimentan las UFC/ml en presencia de suero normal tras la inmunización, va acompañada de un incremento significativo en la concentración de anticuerpos totales y en el título de anticuerpos bactericidas, ya que se

alcanzan, a las 6 semanas de la vacunación, concentraciones de anticuerpos totales de 67,78 µg/ml y un título de anticuerpos bactericidas de 4096 (Figuras 23 y 24).

Aunque la duración de la respuesta de anticuerpos frente al meningococo tras la vacunación en adultos es desconocida, en varios estudios se han encontrado niveles persistentes por encima del nivel pre-vacunación a los 18 meses (241), a los 5 años (242), y más recientemente, Zangwill comprobó que tras 10 años los niveles de anticuerpos anticapsulares totales frente al serogrupo C se mantenían por encima del nivel inicial pre-vacunación (243).

En nuestro estudio, a los 12 meses se mantiene la concentración de anticuerpos (60,18 µg/ml) muy por encima del valor inicial, y del valor obtenido por otros autores en estudios equivalentes (243). No obstante, se observa un ligero descenso, no significativo, con respecto al pico máximo que se alcanzó a las 6 semanas de la vacunación (figura 23).

El título de anticuerpos bactericidas también se mantiene sobre el nivel pre-vacunación con un valor de 256. Después de un año del comienzo del estudio, y con el nivel de anticuerpos señalado, el microorganismo sigue siendo eliminado del medio en las curvas de muerte bacteriana, alcanzándose reducciones de más del 80%, como queda reflejado en los resultados (figura 22), y haciendo que los individuos vacunados continúen protegidos.

Resulta problemático establecer el nivel de anticuerpos totales que confieren protección frente a la enfermedad meningocócica. Algunos autores han considerado un nivel de anticuerpos anticapsulares ≥ 2 µg/ml protector frente al desarrollo de enfermedad invasiva (76). Este nivel deriva de ensayos clínicos en los que la concentración de anticuerpos se determinó por RIA y está basado en la extrapolación de

muestras de población en estudios realizados para el serogrupo A. Hasta el momento estos datos no se han confirmado para el serogrupo C, puesto que las generalizaciones son arriesgadas al existir diferencias de inmunogenicidad entre los diferentes polisacáridos capsulares, y al realizarse los distintos estudios bajo diferentes premisas y metodologías, ya que no se conoce la correlación entre las determinaciones por ELISA, método adoptado por el CDC como estándar (189, 244), y por RIA.

De este modo el nivel de anticuerpos que confiere protección frente al serogrupo C es todavía desconocido, pero hoy se sabe que además de los anticuerpos anticapsulares, responsables en gran medida de la defensa del huésped frente al meningococo a través de la actividad bactericida (245), otros anticuerpos como los relacionados con la opsonización (246), los dirigidos frente a antígenos no capsulares (247), o anticuerpos no bactericidas, pueden estar relacionados con esa defensa. De hecho, se ha comprobado que anticuerpos dirigidos hacia antígenos no capsulares son más importantes para la fagocitosis del serogrupo B que los dirigidos frente a antígenos capsulares (248).

Por otro lado es de gran importancia tratar de determinar en qué medida la respuesta inmune provocada por la vacuna se correlaciona con el nivel de protección y la duración de la inmunidad. Algunos autores apuntan a la fagocitosis como medida para determinar la protección frente al meningococo (65), pero otros prefieren la medida del estallido respiratorio (249), ya que este evento está, probablemente, más relacionado con la muerte bacteriana que la mera ingestión de la fagocitosis, y defienden que es más relevante para comprobar la respuesta a la inmunización.

Nosotros, a la vista de los resultados obtenidos, no podemos asegurar que la muerte por fagocitosis sea predictora de protección frente a *N. meningitidis* C11, puesto que en el ensayo, el microorganismo es eliminado mediante la lisis del complemento

dirigida por los anticuerpos. No en vano los anticuerpos y el sistema de complemento constituyen elementos de crucial importancia con los que cuenta el hospedador para defenderse de las infecciones ocasionadas por el meningococo (245, 250).

De este modo, lo que sí parece claro es la importancia de la actividad bactericida del suero en la eliminación de la bacteria. De hecho, como ha quedado demostrado en diversos estudios (245, 251), la actividad bactericida del suero se correlaciona con protección frente al microorganismo. Concretamente algunos autores señalan que el grado de protección parece tener mayor relación con la actividad bactericida sérica que con los niveles globales de anticuerpos alcanzados (88, 252, 253). Y es que, a pesar de que los anticuerpos funcionales responsables de la defensa frente al meningococo constituyen una parte del total de los anticuerpos determinados por ELISA (243), estos pueden reflejar otros no específicos o no funcionales (254). Además, otras variables como las diferentes subclases de inmunoglobulinas y la afinidad de los anticuerpos por los antígenos son importantes y pueden dificultar el establecimiento del umbral de protección de los anticuerpos a los polisacáridos capsulares (247).

Ya que la relevancia de los anticuerpos puede depender, como hemos visto, de factores como los epítomos antigénicos hacia los que van dirigidos o su afinidad, y teniendo en cuenta nuestros resultados, nos parece más adecuado utilizar como medida de protección la actividad bactericida del suero. Pero creemos que recurrir a ensayos que combinen actividad bactericida, fagocitosis y determinación de anticuerpos sería lo más correcto para comprobar el estado inmune de los vacunados.

Todas estas consideraciones deberán ser mejor examinadas en futuros trabajos que aporten más datos sobre la respuesta inmunológica frente al meningococo.

Por otro lado, no se encontró correlación significativa entre la concentración de anticuerpos totales y la actividad bactericida obtenida en las curvas de letalidad en las que se realizó el tratamiento con suero normal de los voluntarios (S y SP) (tabla 15). Así que no hemos podido establecer una relación estadística entre la reducción del Log_{10} de las UFC/ml y el nivel de anticuerpos anticapsulares inducido a lo largo del ensayo. Esta falta de significación estadística puede haberse debido al pequeño tamaño de la muestra, pero el mismo resultado se obtuvo en un estudio realizado para *H. influenzae* al comparar la concentración de anticuerpos alcanzada tras la vacunación con la reducción del Log_{10} UFC/ml (255).

Ya sabemos que los anticuerpos desempeñan un papel importante en la opsonización del meningococo y en la activación de la vía clásica del complemento, pero su presencia no confiere inmunidad absoluta frente al microorganismo.

Los anticuerpos frente a *N. meningitidis* pertenecen a diferentes clases (isotipos) de inmunoglobulinas, de modo que la protección se debe, principalmente, a la síntesis de anticuerpos bactericidas específicos IgG e IgM frente a los polisacáridos de la cápsula, que promueven la lisis de las bacterias en presencia de complemento. El potencial con el que cuentan los anticuerpos para unirse a los receptores FcR de la superficie de los PMNs o activar el complemento, depende del isotipo al que pertenezcan.

Los anticuerpos que fijan el complemento con más eficacia en los seres humanos son IgG1, IgG3 e IgM. Las clases de inmunoglobulinas que presentan mayor afinidad por los receptores de Fc son IgG1 e IgG3 (66).

Las IgM parecen ser más bactericidas que las IgG, y son inductoras más potentes de la cascada del complemento (249). Sólo una molécula de IgM es capaz de activar el

factor C1q del complemento, mientras que son necesarias dos moléculas de IgG para conseguir el mismo efecto (256). Por otro lado parece ser que las IgM son poco efectivas en la inducción de la fagocitosis, y esto probablemente sea debido a que en la superficie de los PMN existen muy pocos receptores Fc μ (249), a los que estos anticuerpos se unen.

En el suero de nuestros voluntarios no se detectaron anticuerpos antipolisacárido IgG1 e IgG2, pero no se realizó la comprobación para el isotipo IgM. Al estar ausentes las IgG, podría ocurrir que los anticuerpos que predominaran pertenecieran a IgM, lo que explicaría la ausencia de fagocitosis en el ensayo. Estos anticuerpos serían incapaces de inducir la fagocitosis pero podrían activar el complemento y la lisis bacteriana, justificando así nuestros resultados.

En el suero de los sujetos inmunizados de nuestro estudio si se detectaron anticuerpos anti-polisacárido del isotipo IgA (tabla 16). Parece ser que IgA juega un papel más importante en la protección a largo plazo (243). De hecho en nuestras muestras séricas se encontraron niveles de hasta el 57% con respecto a la máxima concentración detectada, a los 12 meses de la vacunación.

La determinación de la distribución de isotipos no era uno de los objetivos fijados en nuestro trabajo, no obstante se necesitan más estudios para aclarar el peso que las subclases de los anticuerpos totales y de los anticuerpos bactericidas tienen en la respuesta a la vacunación meningocócica.

La reducción postvacunación en las UFC/ml no se observó en 2 de los 12 voluntarios participantes (voluntarios nº 6 y nº 11) como se refleja en los resultados (figuras 25 y 26). En ellos ninguno de los tratamientos fue capaz de eliminar al meningococo en ninguna de las visitas realizadas tras la administración de la vacuna,

obteniéndose un crecimiento similar al experimentado por las curvas control en todas ellas. Pero el suero de estos individuos indujo niveles de anticuerpos totales y bactericidas significativamente más elevados que los niveles pre-vacunación (figura 27), y aunque ligeramente más bajos, no se diferenciaban de los inducidos por el resto de los sujetos (tabla 16).

Resultados parecidos a estos se han observado en trabajos anteriores realizados con *H. influenzae* y la vacuna conjugada para este microorganismo, donde a pesar de inducir esta una concentración de anticuerpos anti-poliribosilribitol de 4,9 $\mu\text{g/ml}$, considerados como protectores, el suero de algunos individuos no presentó actividad bactericida (257). Incluso con valores mayores de 8,6 $\mu\text{g/ml}$, y a pesar de presentar concentraciones de inmunoglobulinas IgG que no se diferenciaban de las de los sueros con actividad bactericida, estos otros no fueron capaces de eliminar a la bacteria (258).

Todo ello puede ser debido a la afinidad de los anticuerpos inducidos tras la vacunación, ya que esta puede variar en cada persona, como el título. De este modo, Hetherington en un estudio sobre la correlación entre la afinidad de los anticuerpos y la actividad bactericida del suero obtuvo 9 muestras séricas cuyos anticuerpos mostraron poca afinidad, de tal manera que ninguna de ellas produjo incremento en la actividad bactericida sobre los niveles pre-inmunización, a diferencia de las que mostraban unos anticuerpos con afinidad elevada (255). Este autor señala que la variación en la afinidad podría explicar por qué el suero de algunos individuos inmunizados con la vacuna conjugada frente a *H. influenzae* no presenta actividad bactericida, aunque cuentan con una aparente concentración de anticuerpos adecuada ($>1\mu\text{g/ml}$), y la misma distribución de isotipos y subclases de inmunoglobulinas que otros individuos.

El que la baja afinidad de los anticuerpos esté relacionada con la ausencia de actividad bactericida podría justificar los resultados obtenidos por nosotros para los

voluntarios 6 y 11, ya que el suero de estas muestras podría ser funcionalmente deficiente debido a la presencia en ellas de este tipo de anticuerpos.

Por otro lado ignoramos el estado del sistema de complemento en estos dos individuos, ya que no se llevó a cabo un estudio pormenorizado del mismo. Ambos podrían sufrir una deficiencia en alguno de los factores que participan en la cascada, impidiéndose la formación del complejo de ataque a membrana y la lisis de la bacteria.

No obstante, la descripción de este fenómeno escapa a la investigación realizada en este estudio, pero estamos seguros que futuros trabajos de nuestro Departamento podrán aportar más datos a las explicaciones que nosotros hemos desarrollado aquí.

CONCLUSIONES

Del análisis de la metodología utilizada y de los resultados obtenidos en el ensayo de los antimicrobianos estudiados, podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Los antimicrobianos ensayados en el estudio son capaces de eliminar empíricamente a *Neisseria meningitidis* en la nasofaringe.
- Aunque los betalactámicos muestran pequeñas tasas de penetración en secreciones, en nuestro estudio demostramos que incluso a bajas concentraciones estos antimicrobianos se comportan como bactericidas frente a *N. meningitidis*.
- A la vista de nuestros resultados la actividad de trovafloxacino resulta similar a la de ciprofloxacino frente a la cepa de meningococo estudiada.
- Claritromicina es bactericida a concentraciones que se alcanzan en mucosa faríngea. Es por tanto una opción teórica frente a rifampicina en la profilaxis de la infección meningocócica.
- Los únicos antimicrobianos capaces de inducir un EPA significativo en la cepa ensayada fueron las quinolonas, que retardan el crecimiento del microorganismo en más de 1 hora.

En cuanto al estudio de la inmunización de voluntarios sanos con la vacuna de polisacáridos A-C podemos concluir que:

- La administración de la vacuna se traduce en una respuesta de anticuerpos totales y bactericidas en los individuos participantes en el estudio.
- Los sueros de los sujetos que fueron vacunados inducen una reducción significativa de las UFC/ml en las curvas de muerte bacteriana. Atribuimos esta reducción a la actividad bactericida del suero más que a la fagocitosis realizada por los leucocitos polimorfonucleares.
- Según nuestros resultados el grado de protección se correlaciona mejor con la actividad bactericida del suero, por lo que debe ser cuestionada la muerte por fagocitosis como predictor de protección.
- La protección inducida por la vacuna se mantuvo, al menos, un año después de la inmunización de los voluntarios participantes en el estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Councilman, WT., Mallory, FB., Wright, JH. Epidemic cerebrospinal meningitidis and its relation to other forms of meningitis. Report of the State Board of Health of Massachussetts 1898; 1-178.
2. Wollstein, M. Biological relationships of *Diplococcus intracellularis* and gonococcus. J Exp Med 1907; 9: 588-605.
3. Gordon, MH., Murray, EG. Identification of the meninococcus. J R Army Med Corps 1915; 25: 411-423.
4. Perea, EJ., Pascual, A. Género *Neisseria*. En: JA. García Rodríguez y JJ. Pizazo (eds.). Microbiología Médica I. Microbiología Médica General. Mosby/Doyma. Madrid 1996; 209-221.
5. Bouza E., Bueno R. Documentos Técnicos de Salud Pública. En: Dirección General de Prevención y Promoción de la Salud. Consejería de Sanidad y Servicios Sociales. Comunidad de Madrid (eds). Guía para la prevención y control de las infecciones que causan meningitis 1997. Documento Técnico de Salud Pública nº 44: 7-117.
6. Peltola, H. Meningococcal disease: still with us. Rev Infect Dis 1983; 5:71-91.
7. Duerden, BBI. Meningococcal infection. A review based upon papers presented at the 155th Meeting of the Pathological Society of Great Britain and Ireland at Southampton, 8 July 1987. J Med Microbiol 1988; 26:161-187.
8. Corretger, JM. Vacunas antimeningocócicas. En: FA Moraga Llop (ed.). La enfermedad meningócocia en el niño. Prous Science, Barcelona 1997; 91-98.
9. Frasch, CE., Zollinger, WD., Poolman, JT. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. Rev Inf Dis 1985; 7: 504-510.
10. Abdillahi, H., Poolman, JT., Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. FEMS Microbiol Lett 1987; 48: 367-371.
11. Abdillahi, H., Poolman, JT. *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. Microb Pathog 1988; 4: 27-32.
12. Frasch, CE. Vaccines for the prevention of meningococcal disease. Clin Microbiol Rev 1989; 2(suppl.):S134-S138.
13. Crowe, BA., Wall, RA., Kusecek, B., Neumann, B., Olyhoek, T., Abdillahi, H. Clonal and variable properties of *Neisseria meningitidis* isolated from cases and

- carriers during and after an epidemic in The Gambia, West Africa. *J Infect Dis* 1989; 159: 686-700.
14. Van Deuren, M., Brandtzaeg, P., Van der Meer, JWM. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 144-166.
 15. Olyhoek, T., Crowe, BA., Achtman, M. Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* sero-group A isolated from epidemic and pandemics between 1915 and 1983. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 665-692.
 16. Poolman, JT., Hopman CTP., Zanen, HC. Problems in the definition of meningococcal serotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* 1982; 13:339-348.
 17. Zoolinger WD., Mandrell RE. Outer-membrane protein and lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by inhibition of a solid phase radioimmunoassay. *Infect Immun* 1977; 18:424-433.
 18. Zoolinger WD., Mandrell RE. Type-specific antigens of group A *Neisseria meningitidis*: lipopolysaccharides and heat-modifiable outer membrane proteins. *Infect Immun* 1980; 28:451-458.
 19. Kim, JJ., Mandrell, RE., Griffiss, JM. *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* share lipooligosaccharide epitopes, but lack common capsular and class 1,2, and 3 protein epitopes. *Infect Immun* 1989; 57:602-608.
 20. De Voe, IW., Gilchrist, JE. Pili on meningococci from primary cultures of nasopharyngeal carriers and cerebrospinal fluid of patients with acute disease. *J Exp Med* 1975; 141:297-305.
 21. Stephens, SD., McGee ZA., Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. *J Infect Dis* 1981; 143: 525-532.
 22. Virji, M. Glycosylation of the meningococcus pilus protein. *ASM News* 1998; 64: 398-405.
 23. Nassif, X. Interactions between encapsulated *Neisseria meningitidis* and host cells. *Internatl Microbiol* 1999; 2: 133-136.
 24. Ayala, P., Lin, L., Hooper, D., Fukuda, M., So, M. Infection of epithelial cells by pathogenic neisseriae reduces the levels of multiple lysosomal constituents. *Infect Immun* 1998; 66: 5001-5007.

25. Lin, L., Ayala, P., Larson, J., Mulks, M., Fukuda, M., Carisson, SR., Enns, C., So, M. The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol Microbiol* 1997; 24: 1083-1094.
26. Mulks, HM., Cole, AG., Veldman, HA., Gragionen, B. IgA proteases of two distinct specificities are released by *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 1980; 152: 1442-1447.
27. Anderson, BM., Solberg, O., Bryn, K., Froholm, LO., Gaustad, P., Hoiby, EA., Kristiansen, BE., Bovre, K. Endotoxin liberation from *Neisseria meningitidis* isolated from carriers and clinical cases. *Scand J Infect Dis* 1987; 19: 409-419.
28. Anderson, BM., Solberg, O. Endotoxin liberation associated with growth, encapsulation and virulence of *Neisseria meningitidis*. *Scand J Infect Dis* 1988; 20: 21-31.
29. Stephens, SD., Whitney, AM., Hoffman, LH., Farley, MM., Frach, CE. Analysis of damage to human ciliated nasopharyngeal epithelium by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 1986; 51:579-585.
30. De Voe, IW. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. *Microbiol Rev* 1982; 46: 162-190.
31. Finne, J., Leinonen, M., Mäkelä, PH. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. *Lancet* 1983; ii: 355-357.
32. Tsai, CM., Frasch, CE., Mocca, LF. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 1981; 146: 69-78.
33. Chen, CY., Genco, CA., Rock, JP., Morse, SA. Physiology and metabolism of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: Implications for pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2 (Suppl.): S35-S40.
34. Pettersson, AB., Kuipers, M., Pelzer, M., Verhage, E., Tiesjema, RT., Tommassen, J., Poolman, JT. Monoclonal antibodies against the 70-kilodalton iron regulated protein of *Neisseria meningitidis* are bactericidal and strain specific. *Infect Immun* 1990; 58: 3036-3041.
35. Mandrell, RE., Kim, JJ., John, CM., Gibson, BW., Sugai, JV., Apicella, MA., Griffiss, JM., Yamasaki, R. Endogenous sialylation of the lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 1991; 173: 2823-2832.
36. Griffiss, JM., Goroff, PK. IgA blocks IgM and IgG initiated lysis by separate molecular mechanisms. *J Infect Dis* 1983; 130: 2882-2885.

37. Apicella, MA., Mandrell, RE., Shero, M., Wilson, M., Griffiss, JM., Brooks, GF., Fenner, C., Breen, JF., Rice, PA. Modification by sialic acid of *Neisseria gonorrhoeae* epitope expression in human urethral exudates: an immunoelectron microscope analysis. *J Infect Dis* 1990; 162: 506-512.
38. Mandrell, RE., Lesse, AJ., Sugal, JV., Shero, M., Griffiss, JM., Cole, JA., Parsons, NJ., Smith, H., Morse, SA., Apicella, MA. *In vitro* and *in vivo* modification of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope structure by sialylation. *J Exp Med* 1990; 171: 1649-1664.
39. Estabrook, MM., Norman, C., McLeod Griffiss, CJ., Baker, CJ., Mandrell, R. Sialylation and human neutrophil killing group C *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1992; 166: 1079-1088.
40. Griffiss, JM., Artenstein, MS. The ecology of the genus *Neisseria*. *Mt Sinai J Med* 1976; 43: 746-761.
41. Apicella, MA. *Neisseria meningitidis*. En: GL. Mandell, R. Douglas, J. Bennet (Ed). Principles and practice of infection diseases. Medical publications, New York 1989; 1600-1613.
42. Schwartz, B., Moore, PS., Broome, CV. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev.* 1989; 2 (Suppl.):S118-S124.
43. Nelson, JD. Jails, microbes, and the three-foot barrier. *N Engl J Med* 1996; 335: 885-886.
44. Stephens, SD., Farley, MM. Pathogenic effects during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* 1991; 13:22-33.
45. Stephens, SD., Hoffman, LH., McGee, ZA. Interaction of *Neisseria meningitidis* with nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* 1983; 148:369-376.
46. Schryvers, AB., González, GC. Comparison of the abilities of different sources of iron to enhance *Neisseria meningitidis* infection in mice. *Infect Immun* 1989; 57 (8): 2425-2429.
47. Pachón, J., López Cortés, LF. Meningitis y otras infecciones del Sistema Nervioso Central. En: JA. García Rodríguez y JJ Picazo (eds.). Microbiología Médica 2. Microbiología clínica. Mosby/Doyma. Madrid 1996; 195-211.

48. Ibáñez, C. Protocolo de actuación ante las meningitis. Comunidad de Madrid. Consejería de Salud. Dirección General de Prevención y Protección de la Salud. Documento Técnico de Salud Pública nº 12. 1993.
49. Comunidad de Madrid. Informe: La enfermedad meningocócica en la Comunidad de Madrid, 1997. Consejería de Sanidad y Servicios Sociales Dirección General de Prevención y Promoción de la Salud. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid. Nº 4. Abril 1997. Vol. 5: 3-33.
50. Riedo, FW., Plikaytis, BD., Broome, CV. Epidemiology and prevention of meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:643-657.
51. Baltimore, RS., Feldman, HA. Meningococcal Infections in Bacterial Infections of Humans. *Epidemiology and Control*. Ed Alfred S. Evans and Philip S. Brachman. 1991.
52. Vázquez, JA. Infección meningocócica. Informe del Laboratorio de Referencia de Meningococos (1993-1994). *Bol Epidemiol Microbio* 1995; 3(5): 65-68.
53. Weidmer, CE., Dunkel, TB., Pettyjohn, FS., Smith, CD., Leibovitz, A. Effectiveness of rifampicin in eradicating the meningococcal carrier state en relatively closed population: emergence of resistant strains, *J Infect Dis* 1971; 124:172-178.
54. Schwartz, B. Chemoprophylaxis for bacterial infections: principles of and application to meningococcal infections. *Rev Infect Dis* 1991; 13(suppl 2):S170-S173.
55. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Guía per la prevenció o el control de la malaltia meningocòccica. *Quaderns de Salut Pública*, Barcelona 1994; 9.
56. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Protocol d'actuació davant la malaltia meningocòccica. *Sèrie Documents de Vigilància Epidemiològica*, Barcelona 1991; 6.
57. Sáez Nieto, JA., Fontanals, D., García de Jalón, J. *Neisseria meningitidis* strains with increase of penicillin minimal inhibitory concentrations. *Epidemiol Infect* 1987; 99:463-469.
58. Botha, P. Penicillin-resistance *Neisseria meningitidis* in Southern Africa. *Lancet* 1988; 1:54-58.
59. Buck, G., Adams, M. Meningococcus with reduced susceptibility to penicillin isolated en the United States. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:156-157.

60. Dillon, JR., Pauzé, M., Yeung, KH. Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from the gonococcus to *Neisseria meningitidis*. Lancet 1993; 1:779-781.
61. Oppenheim, BA. Antibiotic resistance in *Neisseria meningitidis*. Clin Infect Dis 1997; 24 (Suppl. 1): S98-S101.
62. Pérez trallero, E., García Arenzana, JM., Ayestaran, I., Munoz Baroja, I. Comparative activity *in vitro* of 16 antimicrobial agents against penicillin susceptible meningococci and meningococci with diminished to penicillin. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33:1622-1623.
63. Sáez Nieto, JA., Luján, R., Martínez-Suárez, JV., Berrón, S., Vázquez, J., Viñas, M., Campos, J. *Neisseria lactamica* and *Neisseria polysaccharea* as possible surces of meningococcal betalactam resistance by genetic trasformation. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:2269-2272.
64. Galimand, M., Ph.D., Gerbaud, G., Guibourdenche, M., Riou, JY., M.D., Courvalin, P. High-level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*. N Engl J Med 1998; 339:868-874.
65. Schlesinger, M., Greenberg, R., Levy, J. Et al. Killing of meningococci by neutrophils: Effect if vaccination on patients with complement deficiency. J Infect Dis 1994; 170: 449-453.
66. Walport, M. El Complemento. En: J Brostoff, D. Male, I. Roitt. Inmunología 4ª edición. Harcourt Brace, Madrid 1997; 13.1-13.17.
67. Kabat, EA., Kaiser, H., Sikorski, H. Preparation of the type-specific polysaccharide of the type I meningococcus and a study of its effectiveness as an antigen in human beings. J Exp Med 1945; 80: 299-307.
68. Gotchlich, EC., Goldschneider, I., Artenstein, SM. Human inmunity to the meningococcus IV. Immunogenicity of group A and group C polysaccharides in human volunteers. Exp Med 1969; 129: 1367-1384.
69. Gotchlich, EC., Rey, M., Triau, R., Sparks, KJ. Quantitative determination of the human immune response to immunization with meningococcal vaccines. J Clin Invest 1972; 51: 89-96.
70. Frasch, CE. Vaccines for the prevention of meningococcal disease. Clin Microbiol Rev 1989; 2(suppl.):S134-S138.

71. Artenstein, RS., Gold, R., Zimmenly, GJ., Wyle, FA., Schneider, H., Harkins, C. Prevention of meningococcal disease by group C polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 1970; 282: 417-420.
72. Gold, R., Lepow, ML., Goldschneider, I., Draper, TF., Gotschlich, EC. Kinetics of antibody production to group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines administered during the first six years of life: prospects for routine immunization of infants and children. *J Infect Dis* 1979; 140: 690-697.
73. Käythy, H., Karanko, V., Peltola, H., Sarna, S., Makela, PH. Serum antibodies to capsular polysaccharide vaccine of group A *Neisseria meningitidis* followed for three years in infants and young children. *J Infect Dis* 1980; 142: 861-868.
74. Lepow, ML., Beeler, J., Randolph, M., Samuelson, JS., Hankins, WA. Reactogenicity and immunogenicity of a quadravalent combined meningococcal vaccine in infants and in children. *J Infect Dis* 1986; 154: 1033-1036.
75. Lepow, ML., Goldschneider, I., Gold, R., Randolph, M., Gotschlich, EC. Persistence of antibody following immunization with groups A and C meningococcal polysaccharide vaccines. *Pediatrics* 1978; 60: 673-680.
76. Peltola, H., Makela, PH., Kaythy, H., Jousimies, H., Herva, E., Hallstorm, K., Sivonen, A., Renkonen, OV., Petty, O., Karanko, V., Akonen, P., Sarna, S. Clinical efficacy of meningococcal A polysaccharide vaccine in children three months to five years of age. *N Engl J Med* 1977; 297: 686-691.
77. Verheul, AFM., Snippe, H., Poolman, JT. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol Rev* 1993; 57:34-39.
78. De Wals, P., et al. Impact of a mass immunization campaign against serogroup C meningococcus in the province of Quebec, Canada. *Bulletin of the World Health Organization*. 1996; 74(4): 407-411.
79. Informe de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Eficacia de la vacuna meningocócica de polisacárido capsular del grupo C. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. Marzo 1997.
80. Plotkin and Mortimer. *Vaccines*. 1994. 2ª Ed.
81. Reingold, AL., Hightower, AW., Bloom, CV., Ajello, GW., Bolaw, GA., Adamsbauw, C., Jones, EE., Phillips, C., tiendrebeogo, H., Yada, A. Age-specific differences in duration of clinical protection after vaccination with polysaccharide A vaccine 1985; ii: 114-118.

82. Centers for Disease Control. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP)- meningococcal vaccines. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1985; 34: 255-259.
83. Eskola, J., Peltola, H., Takala, AK., Kayhty, H., Hakulinen, M., Karanko, V., Kela, E., Rekola, P., Ronnberg, PR., Samuelson, JS., Gordon, LK., Makela, PH. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in infancy. *N Engl J Med* 1987; 317: 717-722.
84. Stein, KE. Thymus-independent and thymus dependent responses to polysaccharide antigens. *J Infect Dis* 1992; 165 (Suppl. 1): S49-S52.
85. Cruse, JM., Lewis, RE. Conjugate vaccines. *Contrib Microbiol Immunol* 1989; 10: 1-196.
86. Anderson, EL., Bowers, T., Mink, CM., Kennedy, DJ., Belshe, RB., Harakeh, H., Pais, L., Holder, P., Carlone, GM. Safety and Immunogenicity of Meningococcal A and C Polysaccharide Conjugate Vaccine in Adults. *Infect Immun* 1994; 62 (8): 3391-3395.
87. Costantino, P., Viti, S., Podda, A., Velmonte, MA., Nencioni, L., Rappali, R. Development and phase I clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C. *Vaccine* 1992; 10: 691-698.
88. Lieberman, JM., Chiu, S., Wong, V., Partridge, S., Chang, SJ., Chiu, CY., Gheesling, L., Carlone, G., Ward, J. Safety and Immunogenicity of a Serogroups A/C *Neisseria meningitidis* Oligosaccharide-Protein Conjugate Vaccine in Young Children. *JAMA* 1996; 275(19): 1499-1503.
89. Osona, B., Casado, J., Menéndez-Rivas, M., Mora, E. Infección meningocócica: Cambios en los serogrupos y en la sensibilidad a penicilina. *An Esp Pediatr* 1997; 46: 233-236.
90. Rougon, G., Dubois, C., Buckley, N., Magnani, JL., Zollinger, W. A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult N-CAM. *J Cell Biol* 1986; 103: 2429-2437.
91. Boslego, JB., García, J., Cruz, C. Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal vaccine group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. *Vaccine* 1995; 13: 821-829.
92. Halstensen, A., Haneberg, B., Frøholm, O., Lehmann, V., Frøsch, CE., Solberg, CO. Human opsonins to meningococci after vaccination. *Infect Immun* 1984; 46: 673-676.

93. Mandrell, RE., Zollinger, WD. Human immune response to meningococcal outer membrane protein epitopes after natural infection or vaccination. *Infect Immun* 1989; 57: 1590-1598.
94. Rosenquist, E., Hartung, S., Froholm, LO., Holby, EA., Boure, K., Zollinger, WD. Antibody responses to serogroup B meningococcal outer membrane antigens after vaccination and infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1543-1548.
95. Frasch, CE. Prospects for the prevention of meningococcal disease: special reference to group B. *Vaccine* 1987; 5: 3-4.
96. Bryant, MC. Antibiotics and their laboratory control. 2^a ed. Butterworths, London, 1972; 1.
97. Dámaso, D., Moreno-López, M., Daza, RM. Betalactaminas I. Penicilinas. En: Dámaso, D., Moreno-López, M., Daza, RM. (Ed.). *Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos. Uso clínico*. Grutesa, Madrid 1984; 119-168.
98. Zimmermann, W., Rosselet, A. Function of the outer membrane of *Escherichia coli* as permeability barrier to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12: 368-372.
99. Curtis, NOC., Orr, D., Ross, GW., Boulton, MG. Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12 and their antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16: 533-539.
100. Dang, PL., Gutmann, L., Quentin, C., Williamson, R., Collatz, E. Some properties of *Serratia marcescens*, *Salmonella paratyphi* A and *Enterobacter cloacae* with non enzyme-dependent multiple resistance to β -lactam antibiotics, aminoglycosides and quinolones. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 899-904.
101. Godfrey, AJ., Shahrabadi, MS., Bryan, LE. Distribution of porin and lipopolysaccharide antigens on a *Pseudomonas aeruginosa* permeability mutant. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 802-805.
102. Sawai, T., Hiruma, R., Kawana, N., Kaneko, M., Taniyasu, F., Inami, A. Outer membrane permeation of β -lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 585-592.
103. Mendelman, PM., Campos, J., Chaffin, D., Serfass, D., Smith, A., Sáez-Nieto, JA. Relative penicillin G resistance in *Neisseria meningitidis* and reduced affinity of penicillin binding protein 3. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 706-709.

104. Sáez Nieto, JA., Luján, R., Berrón, S., Campos, J. Viñas, M., Fusté, C., Vázquez, JA., Zhang, Q-Y., Bowler, J., Martínez-Suárez, V., Spratt, B. Epidemiology and molecular basis of penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in Spain: A 5 year History (1985-1989). Clin Infect Dis 1992; 14: 394-402.
105. Fontanals, D., Pineda, V., Pons, I., Rojo, JC. Penicillin-resistant betalactamase producing *Neisseria meningitidis* in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8: 90-91.
106. Roy, C., Tirado, M., Reig, R., Hermida, M., Fontanals, D., Esteva, C., Vidal, R. Actividad betalactamasa de tipo TEM en una cepa de *Neisseria meningitidis*. Enf Infec Microbiol Clin 1989; 7: 206-209.
107. Liu, CH., Tomasz, A. Penicillin tolerance in multiply drug-resistant natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1985; 152: 365-372.
108. Simon, C., Stille, W., Perea, EJ. Propiedades de los antimicrobianos betalactámicos. En: Salvat (Ed). Manual de terapéutica antimicrobiana. Salvat 1987; 61-112.
109. Brown, AG., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, JD., Reading, C., Rolinson, GN. Naturally-occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. J Antibiotics 1976; 29: 668-669.
110. Rolinson, GN. A review of the microbiology of amoxicillin/clavulanic acid over 15 year period 1978-1993. J Chemother 1994; 6: 283-318.
111. Payne, DJ., Cramp, R., Winstanley, DJ., Knowles, DJC. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam and tazobactam against clinically important betalactamases. Antibicrob Agents Chemother 1994; 38: 767-772.
112. Gruneberg, RN. Antibiotic sensitivities of urinary pathogens, 1971-8. J Clin Paathol 1980; 33: 853-856.
113. Hassam, AZ., Shaw, EJ., Shooter, RA., Caro, DB. Changes in antibiotic sensitivity in strains of *Staphylococcus aureus*, 1952-78. Br Med J 1978; 2: 536-537.
114. O'Brien, TF., Acar, JF., Medeiros, AA., Norton, RA., Goldstein, F., Kent, RL. International comparison of prevalence of resistance to antibiotics. J Am Med Assoc 1978: 1518-1523.
115. Labia, R., Peduzzi, J. Kinetics of β -lactamase inhibition by clavulanic acid. Biochem Biophys Acta 1978; S26: 572-579.

116. Reading, C., Cole, M. Clavulanic acid: A β -lactamase-inhibiting β -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 11: 852-857.
117. Hunter, PA., Coleman, K., Fisher, J., Taylor, D. *In vitro* synergistic properties of clavulanic acid with ampicillin, amoxicillin and ticarcillin. *J Antimicrob Chemother* 1980; 6: 455-470.
118. Neu, HC., Fuk, P. Clavulanic acid, a novel inhibitor of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 14: 650-655.
119. White, AR., Boon, RJ., Masters, PJ., Sutherland, R. Actividad antibacteriana de amoxicilina/ácido clavulánico (augmentine) *in vitro*. En: Laboratorios Beecham, S.A. (Eds.). Augmentine. Revisión microbiológica, farmacológica y clínica. Temis, S.A., Barcelona 1989; 3-18.
120. Pechere, JC., Letarte, R., Guay, R. Inhibitory activity of clavulanic acid against 16 β -lactamases produced by Gram-negative bacteria. En: Nelson, JD., Grassi, C. (Eds.). *Current Chemotherapy and Infectious Disease*, Vol. 1. American Society for Microbiology, Washington DC. 1980; 323-326.
121. Gobernado, M., Santos, M. Quinolonas. En: Drobnic, L. (Ed.). *Tratamiento antimicrobiano*, 2ª ed. EMISA, Madrid 1997; 218-293.
122. Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, H., Itoh, T., Tomizana, JI. Nalidixic acid and resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 4772-4776.
123. Sugino, A., Peebles CL., Kreucer, KN., Cozzarelli, NR. Mechanisms of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nal A gene product and its relationship to DNA gyrase and another nicking-closing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 4761-4771.
124. Fernandes, PB. Mode of action and *in vitro* and *in vivo* activities of fluorquinolones. *J Clin Pharmacol* 1988; 28: 156-168.
125. Hooper, DC., Wolfson, JS. The quinolones: mode of action and bacterial resistance. En: Lorian, V. (Ed.). *Antibiotics in laboratory medicine*, 3ª ed. Williams and Wilkins, Baltimore 1991; 665-690.
126. Lewin, CS., Morrissey, I., Smith, JT. The mode of action of quinolones: the paradox inactivity of low and high concentrations and activity in the environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 240-248.

127. Yoshida, H., Nakamura, M., Bogaky, M., Itoh, T., Kojima, T., Haton, H., Nakamura, S. Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA-gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 839-845.
128. Shen, LL., Mitscher, LA., Sharma, PN. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials. A cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry* 1989; 28:2886-2894.
129. Power, EGM., Muñoz Bellido, JL., Phillips, I. Detection of ciprofloxacin resistance in Gram negative bacteria due to alterations in gyrA. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 9-17.
130. Gutmann, L., Williamson, R., Moreau, N., et al. Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia*. *J Infect Dis* 1985; 151: 501-507.
131. Levy, SB. Active efflux mechanism for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 695-703.
132. Poole, K. Bacterial multidrug-resistance: Emphasis on efflux mechanism and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 453-456.
133. Giner, S., Canós, M., Gobernado, M. Actualidad de las quinolonas. *Rev Esp Quimioterap* 1996; 14: 463-465.
134. Wilson, APR., Grüneberg, RN. Antibacterial activity. En: Maxim Medical (Ed.). *Ciprofloxacin: 10 years of clinical experience*. Maxim Medical, Oxford 1997; 13-46.
135. García Rodríguez, JA. Microbiología de ciprofloxacina. *Drugs of today* 1988; 24 (Suppl. 8): 1-10.
136. Bergan, T., Dalhoff, A., Rohwedder, R. Pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Infection* 1988; 16 (Suppl. 1): 3-13.
137. D'Espine, M., Bellido, F., Pechére, JC. Serum levels of ciprofloxacin after single oral doses in patients with septicemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 1019-1023.
138. Campoli-Richards, DM., Monk, JP., Price, A., Benfield, P., Todd, PA., Ward, A. Ciprofloxacino: Una revisión de la actividad antibacteriana, propiedades farmacocinéticas y uso terapéutico. *Drugs* 1988; 35: 373-447.
139. García Rodríguez, JA. Quinolonas de tercera generación: una nueva oportunidad terapéutica. *Rev Esp Quimioterapia* 1997; 10 (Supl. 1): 3-7.

140. Neu, HC., Chin, N. In vitro activity of the new fluoroquinolone CP-99,219. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2615-2622.
141. Spangler, SK., Jacobs, MR., Appelbaum, PC. Activity of CP-99,219 compared with those of ciprofloxacin, grepafloxacin, metronidazole, ceftiofur, piperacillin and piperacillin-tazobactam against 489 anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2471-2476.
142. Bowker, KE., Wootton, M., Holt, HA., Reeves, DS., MacGovan, AP. The *in vitro* activity of trovafloxacin and nine other antimicrobials against 413 anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 271-281.
143. Teng, R., Harris, SC., Nix, DE., Schentag, JJ., Foulds, G., Liston, TE. Pharmacokinetics and safety of trovafloxacin (CP-99,219), a new quinolone antibiotic, following administration of single oral doses to healthy male volunteers. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 385-394.
144. Frías, J., Gálvez, MA. Farmacocinética y seguridad de trovafloxacino. *Enferm Infec Microbiol Clin* 1998; 16 (Supl. 2): 36-42.
145. Dámaso, D., Moreno-López, M., Daza, RM. Macrólidos y Lincosamidas. En: Dámaso, D., Moreno-López, M., Daza, RM. (Ed.). *Antibióticos y quimioterápicos de uso clínico*. Marketing Pharm, S.A., Madrid 1984; 375-416.
146. Prieto, J., Anta, ML., Alou, L., del Potro, GM. Macrólidos. En: JE. García Sánchez, R. López, J. Prieto (Eds.). *Antimicrobianos en Medicina*. Prous Science, Barcelona 1999; 349-357.
147. Fernandes PB. The macrolide revival: Thirty five years after erythromycin. *Antimicrob Newslett* 1987; 4 (4): 25-33.
148. Mazzei, T., Mini, A., Novelli, A., Periti, P. Chemistry and mode of action of macrolides. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31 (Suppl. C): 1-9.
149. Leclercq, R., Courvalin, P. Intrinsic and unusual resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1273-1276.
150. Goldman, RC., Capobianco, JO. Role of an energy-dependent efflux pump in plasmid pNE24-mediated resistance to 14- and 15-membered macrolides in *Staphylococcus epidermididis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34 (10): 1973-1980.

151. Kirst, HA., Sides, GD. New directions for macrolide antibiotics: Structural modifications and in vitro activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33 (9): 1413-1418.
152. Kirst, HA., Sides, GD. New directions for macrolide antibiotics: Pharmacokinetics and clinical efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33 (9): 1419-1422.
153. Hardy, DJ. Extent and spectrum of the antimicrobial activity of clarithromycin. *Pediatr Infect Dis* 1993; 12: S99-S105.
154. Benson, CA., Segreti, J., Kessler, H. Comparative in vitro activity of A-56268 (TE-031) a new macrolide, compared with that of erythromycin and clindamycin against selected Gram-positive and Gram-negative organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 328-330.
155. Neu, HC. The development of macrolides: Clarithromycin in perspective. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27 (Suppl. A): 44-51.
156. Rabasseda, X. Claritromicina y *Haemophilus influenzae*. Demostración de su eficacia in vivo a partir de estudios clínicos publicados. En: JR Prous (Eds.). *Metaanálisis*. Barcelona 1995; 1-27.
157. Williams, JD., Sefton, AM. Comparison of macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31 (Suppl. C): 11-26.
158. Wehrli, W. Rifampicin: Mechanisms of action and resistance. *Rev Infect Dis* 1983; 5 (Suppl. 3): S407-S411.
159. Dámaso, D. Rifamicinas, mupirocina y fosfomicina. En: JE. García Sánchez, R. López, J. Prieto (Eds.). *Antimicrobianos en Medicina*. Prous Science, Barcelona 1999; 423-436.
160. Jin, DJ., Gross, CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampicin resistance. *J Molecular Biology* 1988; 202: 45-58.
161. Miller, LP., Crawford, JT., Shinnick, TM. The rpoB gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 805-811.
162. Abadi, FJR., Carter, PE., Cash, P., Pennington, TH. Rifampin resistance in *Neisseria meningitidis* due to alterations in membrane permeability. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 646-651.

163. Ohno, H., Koga, H., Kohno, S., Tashiro, T., Hara, K. Relationship between rifampin MICs for and rpoB mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1053-1056.
164. Acocella, G. Clinical pharmacokinetics of rifampicin. *Clin Pharmacok* 1978; 3: 108-127.
165. Buniva, G., Pagani, V., Carozzi, A. Bioavailability of rifampicin capsules. *Internat J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1983; 21: 404-409.
166. Mandell, GL., Sande, MA. Drugs used in the chemotherapy of tuberculosis and leprosy. En: Gilman, AG., Rall, TW., Nies, AS. (Eds.). *The pharmacological basis of therapeutics*, 8th ed. Pergamon Press, New York 1990; 1150.
167. Mitchison, DA. The Garrod Lecture. Understanding the chemotherapy of tuberculosis-current problems. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 477-493.
168. Mirelis, B., Miró, E., del Cuerpo, M., Prats, G. Técnicas para la determinación de la concentración inhibitoria mínima. En: M. Casal (ed.). *Métodos de estudio de la actividad de los antimicrobianos*. Servicio de publicaciones Universidad de Córdoba. Córdoba 1995
169. National Commitee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial test for bacteria that grow aerobically, 3rd ed. Aproved standard. NCCLS document M7-A3. National Commite for clinical Laboratory Standards, 1993 Villanova, Pa.; 25-44.
170. McDonald, PJ., Craig, WA., Kunin, CM. Persistant effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J Infect Dis* 1977; 135: 217-223.
171. Martínez, L. Métodos de estudio y valoración de los antimicrobianos. En: JE. García Sánchez, R. López, J. Prieto (Eds). *Antimicrobianos en Medicina*. Prous Science, Barcelona 1999; 99-107.
172. Craig, WA., Gudmundsson, S. Postantibiotic effect. En: V. Lorian MD. (Ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore 1996; 296-329.
173. Bundtzen, RW., Gerber, AU., Cohn, DL., Craig, WA. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 28-37.
174. Eggleton, P., Gargan, R., Fisher, D. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yields without the use of dextran gradient polymers. *J Immunol Meth* 1989; 121: 105-113.

175. Gargan, RA., Brumfitt, W., Hamilton-Miller, JMT. Failure of water to lyse polymorphonuclear neutrophils completely. Role of pH and implications for assessment of bacterial killing. *J Immunol Methods* 1989; 124: 289-291.
176. Maslanka, SE., Gheesling, LL., Libutti, DE. Standardization and multilaboratory comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup A and C serum bacterial assays. The Multilaboratory Study Group. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 156-167.
177. Gheesling, LL., Carlone, GM., Pais, L. Multicenter comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup C anticapsular polysaccharide antibody levels measured by a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1475-1482.
178. Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA). Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioterap* 2000; 13 (1): 73-86.
179. Luaces, L., García, JJ., Roca, J., Latorre, C. Clinical data in children with meningococcal meningitis in a Spanish hospital. *Acta Pediatr* 1997; 86: 26-29.
180. Otero, MC., Calvo, MA., Pérez-Tamarit, D., Asensi, F. Quimioprofilaxis en meningitis. *Rev Esp Quimioterapia* 1998; 11(2): 118-127.
181. Fernández Viladrich P. Experiencia clínica con ceftriaxona en las infecciones del sistema nervioso central. *Rev Esp Quimioterap* 1996; 9 (Supl. 3): 39-44.
182. García de la Torre, M. Infección meningocócica. Una entidad latente, pero no olvidada. *Rev Clin Esp* 1997; 197 (9): 11-14.
183. Vaqué, J., y Grupo de Trabajo EPINE. Evolución de la prevalencia de las infecciones nosocomiales en los hospitales españoles. Proyecto EPINE 1990-97. Ed. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. 1998.
184. Baquero, F. Uso y consumo de antimicrobianos: Política de antibióticos. En: JR. Cisterna (Ed.). *Antimicrobianos. Plan de Formación en Enfermedades infecciosas (III)*. EMISA, Madrid 1990.
185. Internacional Marketing Services. Estudio de prescripción médica (informe correspondiente a diciembre de 1997). IMS. Madrid 1997.
186. Gomis, M., Sánchez, B., Ledesma, F., Barberán, J. ¿Ha llegado el momento de las quinolonas en el tratamiento de las infecciones respiratorias?. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998; 16 (Supl. 2): 1-7.

187. Fischman, Aj., Babich, JW., Bonab, AA., Alpert, NM., Vincent, J., Callahan, RJ., Correia, JA., Rubin, RH. Pharmacokinetics of [18F]trovafloxacin in healthy human subjects studied with positron emission tomography. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42 (8): 2048-2054.
188. McCoig, C., Wubbel, L., Jafri, HS., Lutsar, I., Bastero, R., Olsen, K., Shelton, S., Friedland, IR., McCracken, GH. Pharmacodynamics of trovafloxacin in experimental pneumococcal meningitis: basis for dosage selection in children with meningitis. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 683-688.
189. Carlone, GM., Frasc, CE., Siber, GR., et al. Multicenter comparison of levels of antibody to the *Neisseria meningitidis* group A capsular antibody measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 154-159.
190. Mattie, H. Kinetics of antimicrobial action. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 19-27.
191. Ferraro, MJ., Craig, WA., Dudley, MN., et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement. NCCLS document M100-S9 1999; 19 (1): 88-89.
192. Sáez Nieto, JA., Vázquez, J. In vitro activities of Ketolides HRM 3647 and HRM 3004, levofloxacin, and other quinolones and macrolides against *Neisseria* spp. and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 983-984.
193. Pascual, A., Joyanes, P., Martínez-Martínez, L., Suárez, AI., Perea, EJ. Comparison of broth microdilution and E-test for susceptibility testing of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 588-591.
194. Rolinson, GN., Stevens, S., Batchelor FR., Cameron-Wood, J. Chain EB bacteriological studies on a new penicillin BRL 1241. *Lancet* 1960; 2: 564-567.
195. Craig, WA., Ebert, SC. Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review. *Scand J Infect Dis* 1991; (Suppl. 74): 63-70.
196. Tuomanen, E. Phenotypic tolerance: The search for betalactam antibiotics that kill nongrowing bacteria. *Rev Infect Dis* 1996; 8 (Suppl. 3): 279-291.
197. Baquero, F. Bases teóricas de la determinación de susceptibilidad a antimicrobianos. En: M. Casal (Ed.). *Métodos de estudio de la actividad de los antimicrobianos*. Servicio de Publicaciones Universidad de Córdoba, Córdoba 1995; 11-24.

198. Severin, A., Severina, E., Tomasz, A. Abnormal physiological properties and altered cell wall composition in *Streptococcus pneumoniae* grown in the presence of clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 504-510.
199. Gómez-Lus, R. Bases farmacodinámicas de la antibioticoterapia. En: Doyma Ed. Eficacia in vivo Eficacia in vitro. Madrid 1997; 29-39.
200. Yourassowsky, E., Van der Linden, MP., Crokaert, F. Rate of bactericidal activity for *Moraxella catarrhalis* of a new macrolide, clarithromycin, compared with that of amoxicillin/clavulanic acid. 17th International Congress of Chemotherapy. June 1991; Berlín (Germany.)
201. Rabasseda, X. Penetración tisular de los antibióticos más frecuentemente utilizados en infecciones respiratorias. En: JR Prous (Eds.). Tratamiento de las infecciones respiratorias. Penetración tisular y CMI₉₀ de diversos antibióticos. Metaevaluación. Prous Science, Barcelona 1998; 3-10.
202. Vázquez, JA., Giménez, MJ., Berrón, S., de la Fuente, L., Aguilar, L. In vitro activity of Gemifloxacin and 13 other antimicrobials against 400 spanish isolates of *Neisseria meningitidis* collected between 1998-1999. 3rd European Congress of Chemotherapy. Abstract M132. *Rev Esp Quimioterap* 2000; 15: 61-62.
203. Marshall, SA., Rhomberg, PR., Jones, RN. Comparative evaluation of E test for susceptibility testing *Neisseria meningitidis* with eight antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 27: 93-97.
204. Abadi, FJR., Yakubu, DE., Pennington, TH. Antimicrobial susceptibility of penicillin-sensitive and penicillin-resistant meningococci. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 687-690.
205. Vesely, JJ., Pien, FD., Pien, BC. Rifampicin, a useful drug for nonmycobacterial infections. *Pharmacotherapy* 1998; 18 (2): 345-357.
206. Darouiche, R., Perkins, B., Musher, D., Hamill, R., Tsai, S. Levels of rifampicin and ciprofloxacin in nasal secretions: correlation with MIC₉₀ and eradication of nasopharyngeal carriage of bacteria. *J Infect Dis* 1990; 162: 1124-1127.
207. Arreaza, L., De la Fuente, L., Fernández, S., Vázquez, JA. Sensibilidad a los principales antimicrobianos empleados en la profilaxis antimeningocócica: situación tras una onda epidémica. *Rev Esp Quimioterap* 2000; 13(2): 182-186.
208. Yagupsky, P., Ashkenazi, S., Block, C. Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease and failure of prophylaxis. *Lancet* 1993; 341: 1152-1153.

209. Almog, R., Block, C., Gdalevich, M., Lev, B., Wiener, M., Ashkenazi, S. First recorded outbreaks of meningococcal disease in the Israel Defence Force: Three clusters due to serogroup C and the emergence of resistance to rifampicin. *Infection* 1994; 22: 69-71.
210. Gobernado, M., Pastor, A., Cantón, E. Efecto postantibiótico. En: M. Casal (ed.). *Métodos de estudio de la actividad de los antimicrobianos*. Servicio de Publicaciones Universidad de Córdoba, Córdoba 1995; 103-128.
211. Hanberger, H., Nilsson, LE., Kihlström, E., Maller, R. Postantibiotic effect of β -lactam antibiotics on *Escherichia coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 102-106.
212. Wilson, DA., Rolinson, GN. The recovery period following exposure bacteria to penicillins. *Chemotherapy* 1979; 25: 14-22.
213. Mínguez, F., Redondo, M., Aparicio, P., Corrales, I., Prieto, J. Efecto postantibiótico de amoxicilina más ácido clavulánico sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Microbiol Clin* 1988; 551-557.
214. MacKenzie, FM., Gould, IM. The post-antibiotic effect. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 519-537.
215. Hanberger, H., Nilsson, LE., Nilsson, M., Maller, R. Post-antibiotic effect of beta-lactam antibiotics on gram-negative bacteria in relation to morphology, initial killing and MIC. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 927-934.
216. Gould; IM., Milne, K., Allison, L., Mackenzie, F., Jason, C. The postantibiotic effect of amoxycillin, co-amoxycylav and clavulanic acid. *Antiinfect Drugs Chemother* 1997; 15: 3-7.
217. Odenholt-Tornquist, I., Löwdin, E., Cars, O. Postantibiotic sub-CMI effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin and amikacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1852-1858.
218. Zhanel, GG., Hoban, DJ., Harding, GKM. The postantibiotic effect: a review of *in vitro* and *in vivo* data. *DICP, The Annals of Pharmacotherapy* 1991; 25: 153-163.
219. Hyatt, JM., Nix, DE., Stratton, CW., Schentag, JJ. *In vitro* pharmacodynamics of piperacillin, piperacillin-tazobactam and ciprofloxacin alone and in combination against *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1711-1716.

220. Gürdal, H., Tulunay, FC., Altay, G. Postantibiotic effect of ofloxacin and the activity of Mg²⁺. J Antimicrob Chemother 1990; 26: 291-300.
221. Hanberger, H., Nilsson, LE., Maller, R., Isaksson, B. Pharmacodynamics of daptomycin and vancomycin on *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* demonstrated by studies of initial killing and postantibiotic effects and influence of Ca²⁺ and albumin on these drugs. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1710-1716.
222. Gould. IM., Jason, AC., Milve, K. Postantibiotic effect and bacterial killing by ciprofloxacin and imipenem alone and in combination. Rev Infect Dis 1989; 11: 5957-5958.
223. Fuursted, K. Postantibiotic effect of ciprofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol 1987; 6: 271-274.
224. De Nollin, S., Van Belle, H., Goosens, F., Thone, F., Borgers, M. Cytochemical and biochemical studies of yeast after *in vitro* exposure to miconazole. Antimicrob Agents Chemother 1977; 1: 500-513.
225. Craig, WA., Vogelmann, B. The postantibiotic effect. Ann Intern Med 1987; 106: 900-902.
226. Mínguez, F., Gómez-Lus, ML., Muro, A., Carbonero, MJ., Gomis, M., Prieto, J. Comparative study of the postantibiotic effect of cefotaxime, amoxicillin, ofloxacin and perfloxacin. Rev Infect Dis 1989; 2 (Suppl. 15): 955-957.
227. Bush, LM., Borcia, JA., Kaye, D. Daptomycin (LY 146034) treatment of experimental enterococci endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 877-881.
228. Fuad, N., Frère, JM., Ghuysen, JM., Diez, C., Iwatsubo, M. Mode of interaction between beta-lactam antibiotics and the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R 39. Biochemical J 1976; 155: 623-629.
229. Arakere, G., Frasch, CE., Specificity of antibodies to o-acetyl-positive and o-acetyl-negative group C meningococcal polysaccharides in sera from vaccinees and carriers. Infect Immun 1991; 59: 4349-4356.
230. Mickelsen, PA., Blackman, E., Sparling, FP. Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species to obtain iron from transferrin and iron compounds. Infect Immun 1981; 33: 555-564.

231. Mickelsen, PA., Blackman, E., Sparling, FP. Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and comensal *Neisseria* species to obtain iron from lactoferrin. *Infect Immun* 1982; 35: 915-920.
232. Pumarola, A. *Neisseria: N. meningitidis*. En A. Pumarola A. Rodríguez-Torres, G. Piédrola-Angulo (Eds.). *Microbiología y Parasitología Médica* 2ª edición. Salvat. Barcelona 1987; 358-363.
233. Roberts, RB., The relationship between group A and group C meningococcal polysaccharides and serum opsonins in man. *J Exp Med* 1970; 131: 409-513.
234. Ross, Sc., Rosenthal, PJ., Berberich, HM., Densen, P. Killing of *Neisseria meningitidis* by human neutrophils: implications for normal and complement-deficient individuals. *J Infect Dis* 1987; 155:1266-1275.
235. Estabrook, MM., Norman, C., McLeod Griffiss, CJ., Baker, CJ., Mandrell, R. Sialylation and human neutrophil killing group C *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 1992; 166: 1079-1088.
236. Fisher, DH., Rest, RF. Gonococci possessing only specific P.II outer membrane proteins interact with human neutrophils. *Infect Immun* 1988; 56; 1574-1579.
237. Naidu, FL., Rest, RF. Stimulation of human neutrophil oxidative metabolism by nonopsonized *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1991; 59: 4383-4390.
238. Rest, RF., Frangipane, JV. Growth of *Neisseria gonorrhoeae* in CMP-N-acetylneuraminic acid inhibits nonopsonic (opacity-associated outer membrane protein-mediated) interactions with human neutrophils. *Infect Immun* 1992; 60: 989-997.
239. Estabrook, MM., Dhou, D., Apicella, MA. Nonopsonic phagocytosis of group C *Neisseria meningitidis* by human neutrophils. *Infect Immun* 1998; 66: 1028-1036.
240. Rautonen, N., Pelkonen, J., Sipinen, S., Kayhty, H., Makela, O. Isotype concentrations for human antibodies to group A meningococcal polysaccharide. *J Immunol* 1986; 137: 2670-2675.
241. Artenstein, MS. Meningococcal infections. 5. Duration of polysaccharide-vaccine-induced antibody. *Bull WHO* 1971; 45: 291-293.
242. Brandt, BT., Artenstein, MS. Duration of antibody responses after vaccination with group C *Neisseria meningitidis* polysaccharide. *J Infect Dis* 1975; 131: S69-S72.

243. Zangwill, KM., Stout, RW., Carlone, GM., Pais, L., Harekeh, H., Mitchell, S., Wolfe, WH., Blackwood, V., Plikaytis, BD., Wenger, JD. Duration of antibody response after meningococcal polysaccharide vaccination in US air force personnel. *J Infect Dis* 1994; 169: 847-852.
244. Report of the 2nd International Workshop on Meningococcal Immunology and Serology, Decatur, GA, 1992 (available on request from Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta).
245. Goldschneider, I., Gotschlich, EC., Artenstein, MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 1969; 129: 1307-1326.
246. Sjørnsen, H., Bjerknes, R., Halstensen, A. Serum opsonins to group B meningococci. *Acta Pathol Microbiol Scand [C]* 1987; 95: 283-289.
247. Andreoni, J., Käythy, H., Densen, P. Vaccination and the role of capsular polysaccharide antibody in prevention recurrent meningococcal disease in late complement component-deficient individuals. *J Infect Dis* 1993; 168: 227-231.
248. Guttormsen, HK., Bjerknes, R., Naess, A., Lehmann, V., Halstensen, A., Sørnes, S., Solberg, CO. Cross-reacting serum opsonins in patients with meningococcal disease. *Infect Immun* 1992; 60: 2777-2783.
249. Aase, A., Bjune, G., Høiby, EA., Rosenqvist, E., Pedersen, AK., Michaelsen, TE. Comparison among opsonic activity, antimeningococcal immunoglobulin G response, and serum bactericidal activity against meningococci in sera from vaccinees after immunization with a serogroup B outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun* 1995; 63: 3531-3536.
250. Goldschneider, I., Gotschlich, EC., Artenstein, MS. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J Exp Med* 1969; 129: 1327-1348.
251. Ross, SC., Densen, P. Complement deficiency states and infections: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine* 1984; 63: 243-272.
252. González, JI., Saiz, C., Cortina, P. Vacunas frente al meningococo serogrupo C. *Medicina Integral* 1997; 30 (5): 222-226.
253. Milagres, LG., Ramos, SR., Sacchi, CT. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. *Infect Immun* 1994; 62: 4419-4424.

254. Mitchell, LA., Ochnio, JJ., Glover, C., Lee, AY., Ho, MKL., Bell, A. Analysis of meningococcal serogroup C-specific antibody levels in british columbian children and adolescents. *J Infect Dis* 1996; 173: 1009-1013.
255. Hetherington, SV., Lepow, ML. Correlation between antibody and serum bactericidal activity in infants. *J Infect Dis* 1992; 165: 753-756.
256. Fredlund, H. Serum factors and polymorphonuclear leukocytes in human host defence against *Neisseria meningitidis*. Studies of interactions with special reference to a chemiluminometric technique. *Scan J Infect Dis* 1993; (Suppl. 87): 3-72
257. Musher, D., Goree, A., Murphy, T., et al. Immunity to *Haemophilus influenzae* type b in young adults: correlation of bactericidal and opsonizing activity of serum with antibody to polyribosylribitol phosphate and lipooligosaccharide before and after vaccination. *J Infect Dis* 1986; 154: 935-943.
258. Amir, J., Liang, X., Granoff, DM. Variability in the functional activity of vaccine-induced antibody to *Haemophilus influenzae* type b. *Pediatr Res* 1990; 27: 358-343.